

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Expression von β -Defensinen in menschlichen Haarfollikeln

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leys Anita Luya Estrada

aus Lima, Peru

Datum der Promotion: 25. 06. 2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abstract	7
1 Einleitung	9
1.1 Barrierefunktion der menschlichen Haut.....	9
1.2 Die Immunabwehr	10
1.3 Antimikrobielle Peptide.....	11
1.4 β -Defensine und andere antimikrobielle Peptide in der Haut	11
1.4.1 Mechanismus der induzierten Peptidantibiotika-Synthese in der Haut des Menschen..	12
1.5 Die Gruppe der Defensine	13
1.5.1 Subtypen der humanen β -Defensine:.....	14
1.6 Mediatorfunktionen humaner β -Defensine	16
1.6.1 Die Mechanismen, durch die Defensine an der anpassungsfähigen (erworbenen) antimikrobiellen Immunität des Wirts teilnehmen	18
1.6.2 Der antimikrobielle Mechanismus der β -Defensine.....	19
1.7 Die Bedeutung von Haarfollikeln als Barriereunterbrechung und Ort der Immunfunktion	20
1.7.1 Der Aufbau des anagenen Haarfollikels	20
1.7.2 Terminalhaarfollikel (THF).....	24
1.7.3 Vellushaarfollikel (VHF)	25
1.7.4 Der Intermediärhaarfollikel.....	26
1.7.5 Haare als besondere Strukturen innerhalb der Barriere	26
1.7.6 Besiedlungen der Haarfollikel.....	27
1.7.7 Haarfollikel und Immunfunktion	28
1.7.8 β -Defensine im Haarfollikel.....	30
1.8 Zielsetzung/Fragestellung.....	31
2 Material und Methoden	33
2.1 Immunhistochemie.....	33
2.1.1 Prinzip.....	33
2.1.2 Anfertigung von Gefrierschnitten	34
2.1.3 Durchführung der Avidin-Biotin-Methode.....	35
2.1.4 Evaluation der Immunfärbung.....	37
2.1.5 Verwendete Materialien	38
2.2 Immunfluoreszenz.....	41

2.2.1	Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen	41
2.2.1.1	Prinzip.....	41
2.2.2	Anfertigung von Kryostatschnitten	42
2.2.3	Durchführung der Immunfluoreszenz.....	43
2.2.4	Materialien, Reagenzien, Geräte.....	44
2.2.5	Auswertung	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in den untersuchten Gewebeproben ...	48
3.1.1	Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in gesunder Haut	53
3.1.2	Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Haarfollikelapparat.....	54
3.1.3	Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaarfollikelapparat.....	55
3.1.3.1	Im Terminalhaarfollikel (THF).....	55
3.1.3.2	In den Talgdrüsen des Terminalhaarfollikelapparates	61
3.1.4	Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaarfollikelapparat.....	62
3.1.4.1	Im Vellushaarfollikel (VHF)	62
3.1.4.2	In den Talgdrüsen des Vellushaarfollikelapparates	69
3.2	Vergleichende Darstellungen und auffälliges Markierungsverhalten.....	71
3.2.1	Gegenüberstellung des immunhistochemischen Färbeverhaltens der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Schweißdrüse.....	84
3.3	Besonderheiten	86
3.4	Immunfluoreszenz.....	90
3.4.1	Besonderheit der Immunfluoreszenz	96
3.4.2	Zusammenfassung der Untersuchungen zur Immunfluoreszenz	97
3.5	Vergleich zwischen Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	98
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	99

4	Diskussion	100
4.1	Allgemein.....	100
4.1.1	β -Defensine an den Grenzflächen zur Außenwelt	101
4.1.2	hBD-1, hBD-2 und hBD-3 als immunstimulatorische Moleküle im distalen Haarfollikel	103
4.1.3	hBD-2 und hBD-3 als immunsuppressive Mediatoren im proximalen Haarfollikel ...	103
4.2	β -Defensine als Immunmodulatoren.....	105
4.2.1	β -Defensine und die Beeinflussung der Pigmentierung.....	107
4.2.2	hBD-3 und ihre Wirksamkeit bei Melanocortinrezeptoren	107
4.2.3	β -Defensine als Immunsuppressoren.....	108
4.3	β -Defensine im Haarfollikel.....	109
4.3.1	β -Defensine in der distalen ÄWS	109
4.3.2	β -Defensine in der zentralen ÄWS und in der Wulstregion	110
4.3.3	β -Defensine in der proximalen ÄWS	111
4.3.4	β -Defensine in der IWS und im Bulbus.....	111
4.3.5	Besonderheit der β -Defensine	112
4.3.6	β -Defensine im Vergleich distaler und proximaler Haarfollikel	114
4.4	β -Defensine in THF vs VHF.....	115
4.5	β -Defensine im Haut- und im Haarfollikel-Immunsystem	116
4.6	Die Rolle der Zytokine und der Toll-like-Rezeptoren bei β -Defensinen.....	118
4.7	Die Rolle der β -Defensin-Zytokine bei Erkrankungen der Haut und des Haarfollikels	120
4.8	β -Defensine und Neoplasien der Haut	122
4.9	β -Defensine als Antibiotika und Immunmodulatoren der Zukunft	123
5	Zusammenfassung	125
6	Literaturverzeichnis	127
7	Anhang	142
8	Lebenslauf	146
9	Publikationen	147
10	Eidesstattliche Versicherung	148
11	Danksagung	149

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
Θ	theta
AA	Alopecia areata
Abb.	Abbildung
aqua dest.	destilliertes Wasser
ALP	Antileukoprotease
AMP	antimikrobielle Peptide
ÄWS	äußere Wurzelscheide
ÄWS-ÄZ	äußere Wurzelscheide - äußere Zellen
ÄWS-IZ	äußere Wurzelscheide - innere Zellen
bzw.	beziehungsweise
CCR 6	Chemokinrezeptor 6
cm	Zentimeter
d. h.	das heißt
DP	dermale Papille
Ep	Epithelzellen
et al.	und Mitarbeiter (et alii)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
F	Fluoreszenzfarbstoff
°C	Grad Celsius
HNP	α -Defensine
hBD	humanes β -Defensin
hBD-1	humanes β -Defensin-1
hBD-2	humanes β -Defensin-2
hBD-3	humanes β -Defensin-3
HF	Haarfollikel
iDCs	unreife dendritische Zellen
IHF	Intermediärhaarfollikel
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IL-1 α	Interleukin-1-alpha
IL-1 β	Interleukin-1-beta
IFN	Interferon
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gamma
IFG-1	insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1

IP	Immunprivileg
IWS	innere Wurzelscheide
IR	Immunreaktivität
LPS	Lipopolysaccharide
LL-37	Cathelicidins namens
LN	Lymphknoten
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mDC	mature dendritische Zellen
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NK	natürliche Killerzellen
NS	Normalserum
n. a.	nicht ausgewertet
nm	Nanometer
OSCC	orales Plattenepithel-Karzinom
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAK	Primärantikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
P	Peroxidase
SA	Serumalbumin
SAK	Sekundärantikörper
Std.	Stunde
Strat.	Stratum
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
THF	Terminalhaarfollikel
TH1	T-Zell-Hilfe 1
TH2	T-Zell-Hilfe 2
TGF- α	transformierender Wachstumsfaktor-alpha
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TLR	Toll-Like-Rezeptor
VHF	Vellushaarfollikel
μ	mikro (x 10 ⁻⁶)
u. a.	unter anderem
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
z. B.	zum Beispiel

Abstract

Haarfollikel stellen eine Unterbrechung der kontinuierlichen Barriere der Haut dar. Als Reservoir für topisch applizierte Substanzen, aber auch für eine mikrobielle Kolonisation ist u. a. das Infundibulum ein Ort intensiver Interaktion mit Umweltfaktoren. Antimikrobielle Peptide wie β -Defensine sind wichtige Abwehr- und Botenstoffe und haben zusätzliche regulatorische Funktionen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionsmuster von β -Defensinen in Vellus (VHF)- und Terminalhaarfollikeln (THF) vergleichend zu analysieren und hieraus Schlussfolgerungen bezüglich weitergehender biologischer Funktionen zu ziehen.

Haarfollikel-tragende Gewebeschnitte menschlicher Haut des behaarten Kopfes und der Retroaurikularregion wurden mittels immunhistochemischer und immunfluoreszierender Färbungen hinsichtlich der Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2, hBD-3 untersucht. Insgesamt wurden 148 Kryostatschnitte beurteilt (hBD-1 = 51, hBD-2 = 54, hBD-3 = 43). Die Auswertung der Lokalisation und Intensität der Färbungen erfolgte semiquantitativ unter Berücksichtigung der anatomischen Schicht des Follikels sowie der Tiefe der Kompartimente in der Haut, unterteilt in Infundibulum, Isthmus, infraseboglandulären und suprabulbären Bereich, Haarbulbus und Talgdrüse.

In Bereichen, in denen von einer hohen immunologischen Aktivität ausgegangen werden kann, fanden wir in unserer Untersuchung eine entsprechend starke konstitutive Expression der drei β -Defensine, so in der distalen äußeren Wurzelscheide (ÄWS), um den Haarkanal herum und im Bereich der Einmündung der Talgdrüsengänge. Im Weiteren ergab sich ein deutlich differenziertes Bild. Eine maximale Expression von hBD-3 fand sich in der ÄWS im proximalen Follikel. Im Gegensatz dazu ließen sich hBD-1 und hBD-2 vorwiegend im distalen Follikel nachweisen. In der inneren Wurzelscheide des Haarfollikels wurden die drei β -Defensine in allen Haartypen sehr ausgeprägt exprimiert, aber mit unterschiedlichen Verteilungen. Als Besonderheit war in der Medulla (THF) eine stärkere Expression von hBD-1 und hBD-2 zu finden. Auch in der fibrösen Hülle und in der Grenzzone zwischen der äußeren und inneren Wurzelscheide konnte eine starke Immunfärbung von hBD-3 dargestellt werden.

Sowohl in VHF als auch in THF wurden alle untersuchten β -Defensine exprimiert. Obwohl die Größendimensionen der Follikeltypen sehr unterschiedlich sind und eine unterschiedliche mikrobielle Kolonisierung angenommen werden muss, fanden sich keine grundsätzlichen Unterschiede in den Expressionsmustern.

Die Funktion der Expression der immunstimulatorischen Moleküle hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im distalen Haarfollikel entspricht der aus der interfollikulären Epidermis bekannten Funktion im Rahmen der natürlichen Immunabwehr. Die Expression von hBD-2 sowie hBD-3 in klar definierten Kompartimenten der tieferen Haarfollikelabschnitte weist neben der antimikrobiellen auf eine zusätzliche regulatorische Funktion hin. Molekulare Verknüpfungen mit Signalwegen, die u. a. an der Aufrechterhaltung des bulbären Immunprivilegs beteiligt sind, sind beschrieben, so dass die vorliegenden Befunde wichtige Anknüpfungspunkte für weitergehende Untersuchungen ergeben.

Abstract (englisch)

Hair-follicles constitute disruptions of the continuous skin-barrier. Being a reservoir for topically applied substances but also for microbial colonization the infundibulum serves as a place of intensive interaction with environmental factors. Antimicrobial peptides like β -defensins are important defence- and messenger-molecules with regulative functions.

The aim of this thesis was to compare the expression-pattern of β -defensins in vellus (VHF)- and terminal hair-follicles (THF) to draw conclusions regarding additional biological functions.

Tissue-sections bearing hair-follicles of human hairy scalp and of the retroauricular area were analyzed for the expression of the β -defensins hBD-1, hBD-2 und hBD-3 using immunohistochemic and immunofluorescent stainings. A total of 148 cryosections were assessed (hBD-1=51, hBD-2=54, hBD-3=43). The semiquantitative evaluation of the localization and intensity of the stainings includes the anatomical layer of the follicle and the depth of the skin compartment, segmented into infundibulum, isthmus, infra-sebaceousglandular and supra-bulbar areas, hair-bulb and sebaceous gland.

In areas of presumably high immunological activity i. e. in the distal part of the outer root sheath (ORS), around the hair-channel and near the junction of the sebaceous gland-ducts we detected a high constitutive expression of the three β -defensins. Further examinations revealed a more differentiated pattern. The highest expression of hBD-3 was found in the ORS of the proximal follicle, whereas hBD-1 und hBD-2 could be predominantly detected in the distal follicles. The three β -defensins were strongly expressed in the inner root-sheath of the hair-follicle of all hair-types, but with different distributions. As a special feature there was a stronger expression of hBD-1 und hBD-2 in the medulla. Additionally a strong immunological staining of hBD-3 was detected in the fibrotic cover and in border-zone between outer and inner ORS.

All examined β -defensins were expressed in VHF as well as in THF. In spite of the different size dimension of the follicle-types and the presumably different microbial colonization no principal differences in the expression-patterns could be found.

The function of the expression of the immunostimulatory molecules hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in the distal hair-follicles is equivalent to the one in the interfollicular epidermis within the scope of the natural immune-defence. The expression of hBD-2 und hBD-3 in clearly defined compartments of deeper hair-follicle-parts refers to a regulative function beyond the antimicrobial properties. Molecular links to signal-pathways which are involved in the maintenance of the bulbar immune-privilege are described, revealing important links for further studies.

1 Einleitung

Gegenstand dieser Dissertation ist die Untersuchung der Expression von β -Defensinen im menschlichen Haarfollikel. Dieses endogene Peptid-Antibiotikum aus der Defensin-Familie wird dem ursprünglichen, unspezifischen Immunsystem zugerechnet.

1.1 Barrierefunktion der menschlichen Haut

Die menschliche Haut steht als äußerste Barriere des Körpers in ständigem Kontakt mit der lebenden Umwelt und ist einer Vielzahl von schädlichen Einflüssen ausgesetzt. Die Kolonisierung mit verschiedensten Bakterien, das Mikrobiom unserer Haut, ist ein wichtiger Aspekt für die Hauthomöostase. Trotz einer permanenten mikrobiellen Besiedlung kommt es bei gesunden Menschen jedoch nur relativ selten zu Hautinfektionen durch pathogene Mikroorganismen. Dies gilt für Pilze, Viren und Bakterien gleichermaßen (Fitzpatrick et al., 1993; Brodell and Rosenthal, 2008).

Eine intakte physikalische Barriere ist für die Infektionsabwehr der Haut zwar von großer Bedeutung, diese allein erklärt jedoch nicht die natürliche Resistenz. Weitere physikalische Faktoren spielen eine wichtige Rolle. Tatsächlich handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel von physikalischen und biochemischen Faktoren.

Zum Beispiel führt die Desquamation des Stratum corneum zu einer ständigen Erneuerung der epithelialen Oberflächen und damit zu einer Verringerung der mikrobiellen Besiedlung.

Durch das saure Milieu der Haut und eine komplexe Lipidmatrix werden Infektionen zusätzlich erschwert.

Hautanhangsgebilde, darunter Schweißdrüsen, jedoch insbesondere die Haarfollikel stellen eine Unterbrechung der kontinuierlichen Barriere der Haut dar. Besonders der oberflächennahe Teil des Follikels ist mit einer hohen Dichte an antigenpräsentierenden Zellen ausgestattet und fungiert im Bereich dieser Eintrittspforte für mikrobielle Invasion und Allergene als Ort intensiver Interaktionen mit dem Immunsystem.

Zu den wichtigen biochemischen Faktoren der Hautbarriere zählt die Produktion antimikrobieller Substanzen, wie der antimikrobiellen Peptide (AMP), welche ein elementarer Faktor der natürlichen Resistenz sind. Hierbei ergänzen sich konstitutiv exprimierte AMP und erregerspezifische, induzierbare Peptide zu einer sogenannten „chemischen Barriere“ der Haut als Abwehrsystem, deren Hauptwirkort sich wahrscheinlich in den oberen Schichten der Epidermis befindet (Boman, 2000; Schröder und Harder, 2006). AMP stellen daher bedeutende Faktoren für den Erhalt der Gesundheit der Haut dar.

Das biochemische Abwehrsystem

Zahlreiche Studien der letzten Jahre belegen die Bedeutung eines biochemischen Abwehrsystems für den Erhalt der Integrität der Epithelien. Es zeigte sich insbesondere, dass den antimikrobiell

wirksamen Proteinen als phylogenetisch alten Effektormolekülen eine Schlüsselrolle bei der angeborenen Immunität der Epithelien zukommen könnte (Schröder, 1999a).

Für den Schutz der Hautbarriere als Ort des permanenten Kontakts mit Mikroorganismen wurde u. a. die Gruppe der humanen Defensine als relevante antimikrobielle Peptide beschrieben.

1.2 Die Immunabwehr

Zur Bekämpfung von körperfremden Stoffen, die ihn schädigen oder zumindest in seiner Funktion beeinträchtigen können, hat der menschliche Körper eine Vielzahl von Schutzmechanismen entwickelt, die sich einerseits in eine unspezifische, angeborene und andererseits in eine spezifische, erworbene Immunabwehr gliedern lassen.

Das angeborene Immunsystem ist eine erste Barriere gegen pathologische Einflüsse von außen (Fearon et al., 1996; Medzhitov und Janeway, 1997; Matzinger, 1998), sie wird nach einer mikrobiellen Invasion sofort ausgelöst und besitzt auch eine Schlüsselrolle bei der Induktion der späteren antigenspezifischen, adaptiven Immunantwort.

Die angeborene Immunität ist ein effektiver Verteidigungsmechanismus. Zu diesem System gehören:

- das Komplementsystem, die Fresszellen (Makrophagen), die natürlichen Killerzellen
- zelluläre Faktoren: Phagozyten, NK, interdigitierende dendritische Zelle (Langerhanszellen der Haut) und Mastzellen
- humorale Faktoren: **Defensine**, Peptidantibiotika in Haut, Schweiß, Lysozyme, Komplemente, TNF- α , Interleukine, Integrine

Das angeborene Immunsystem hat demnach folgende Aufgaben: a) die Erkennung von Mikroorganismen als fremd; b) die initiale Bekämpfung und Eliminierung des Pathogens; c) die Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Blutphagozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten, zirkulieren im Blut. In den Phago lysosomen gibt es eine Reihe von Proteinen, die den phagozytierten Mikroorganismus abtöten. Dazu gehören außer proteolytischen Enzymen und Sauerstoffradikalen vor allem antimikrobielle Peptide und Proteine, wie die sogenannten Defensine (Ganz und Lehrer, 1998, 1999). Defensine sind niedermolekulare, antimikrobielle Peptide und spielen eine wichtige Rolle in den ersten Stadien einer Infektion (Ganz, 2003; Lehrer, 2004).

Daneben besitzt der Mensch auch eine erworbene oder adaptive Immunabwehr. Dieser Teil des Immunsystems zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, körperfremde Strukturen zu erkennen und über spezifische Reaktionen zu eliminieren. Teil der adaptiven Immunabwehr sind Antigen-

spezifische Zellen, die sogenannten T- und B-Lymphozyten, die bei Kontakt mit „ihrem“ Antigen aktiviert werden. Neben der Zerstörung von mit Antikörpern markierten Antigenstrukturen haben T-Lymphozyten die Aufgabe, B-Lymphozyten zu stimulieren, so dass sie in Antikörperproduzierende Plasmazellen differenzieren. Zwischen dem Erstkontakt des adaptiven Immunsystems mit dem Antigen und der Verfügbarkeit des entsprechenden Antikörpers kann ein Zeitraum von sieben Tagen verstreichen (Hancock und Diamond, 2000).

1.3 Antimikrobielle Peptide

Die Produktion der natürlichen antibiotischen Peptide ist als wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität in Pflanzen und in Tieren beschrieben worden (Gabay, 1994; Ganz 1999). Untersuchungen am Menschen haben ergeben, dass individuelle AMP verschiedene Aktivitäten ausüben, die über die antifungale, antivirale, antiparasitäre Abwehr hinaus in zahlreiche Prozesse eingehen (Hancock und Chapple, 1999). AMP sind zudem für ihre Assoziation mit inflammatorischen Dermatosen und der Wundheilung bekannt (Nizet et al., 2001; Gambichler et al., 2008; Ong et al., 2002; Dressel et al., 2010).

Es wurden bisher über 100 verschiedene antimikrobielle Peptide entdeckt und benannt (Nicolas und Mor, 1995; Yang et al., 1999). Die Defensine stellen eine wichtige Untergruppe dar.

Von den insgesamt 18–42 Aminosäuren der Peptide hat ein großer Anteil basischen Charakter (Lysin, Arginin). Die mikrobiozide Wirkung der Defensine setzt an der Zytoplasmamembran der Mikroorganismen an (Yang et al., 2002; Hoover et al., 2000). Als wichtige Komponente der angeborenen Immunität verfügen Defensine über ein breites antimikrobielles Wirkspektrum und agieren immunmodulatorisch, indem sie u. a. Monozyten chemotaktisch anlocken. Neuere Befunde legen nahe, dass Defensine auch beim adaptiven Immunsystem eine Rolle spielen (Yang et al., 1999, 2000).

1.4 β -Defensine und andere antimikrobielle Peptide in der Haut

Die Haut trägt aktiv zur Wirtsabwehr durch Errichtung der angeborenen Immunantwort bei, welche die Produktion der antimikrobiellen Peptide einschließt (Gallo und Huttner, 1998; Nizet et al., 2001; Ong et al., 2002). Diese Peptide, welche die β -Defensine und die Cathelicidin-Gen-Familien einschließen, aber nicht auf sie begrenzt sind, stellen ein schnelles, breites Abwehrspektrum gegen Infektionen durch ihr Agieren als natürliche Antibiotika bereit. Wie bereits eingangs beschrieben sind sie durch Teilnahme an den Wirtszellenprozessen in die Immunabwehr involviert.

Die Chemoattraktant-Eigenschaften von β -Defensinen und Cathelicidinen können diesen Prozess durch ihre Funktionsinteraktionen mit den leukozytären Oberflächenrezeptoren weiter verstärken. Die wachsende Zahl der identifizierten Multifunktionspeptide, die das Mikrobewachstum inhibieren, erweitert das Säugetier-antimikrobielle Arsenal und zeigt, dass das wirtsspezifische

antimikrobielle Peptid-Abwehrsystem sowohl direkt als auch indirekt bei der Verhinderung von Hautinfektionen fungiert (Braff et al., 2005).

Im Falle einer Infektion oder Verletzung ist die antimikrobielle Peptidexpression wegen der erhöhten Synthese durch Keratinozyten und der Absetzung von Degranulationen der angezogenen Neutrophile in der Haut hoch reguliert.

Eine konstitutive und induzierbare Expression der menschlichen β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 sowie des menschlichen Cathelicidin ist in den epidermalen Keratinozyten beobachtet worden (Frohm et al., 1997; Dorschner et al., 2001; Harder et al., 2001).

Die Expression von hBD-2 ist nach einer Verletzung erhöht. Chronische Wunden zeigen häufig eine konstitutive Expression von hBD-2, die sich möglicherweise bei fortschreitender Gewebeerletzung und bakterieller Kolonisation (Butmarc et al., 2004) noch weiter steigern kann. Die β -Defensine fördern die Proliferation der Epithelzellen, um sie in die Wundheilung mit einzubeziehen (Van Wetering, 1999). Diese biologischen Funktionen erhärten die wichtige Rolle der β -Defensine als multifunktionale Zelleffektormoleküle – zusätzlich zu ihrer wichtigen Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunabwehr.

1.4.1 Mechanismus der induzierten Peptidantibiotika-Synthese in der Haut des Menschen

Gesunde Epithelien (Haut, Schleimhaut) produzieren normalerweise eine Reihe antimikrobieller Peptide (z. B. Lysozym, Antileukoprotease (ALP), hBD-1 und Dermcidin). Geraten Bakterien oder Pilze in Kontakt mit lebenden Keratinozyten (z. B. bei einer Störung der physikalischen Barriere), so wird nach dem Binden über spezifische Erkennungsstrukturen an der nach außen gerichteten Seite der Epidermis als Antwort eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu einer massiven Produktion induzierbarer antimikrobieller Peptide (beim Menschen: hBD-2, hBD-3, LL-37 u. a.) führt. Gleichzeitig bewirken chemotaktische Eigenschaften dieser Peptide die Einwanderung von Immunzellen (immature dendritische Zellen und Memory-T-Lymphozyten), die über einen Chemokinrezeptor vermittelt werden.

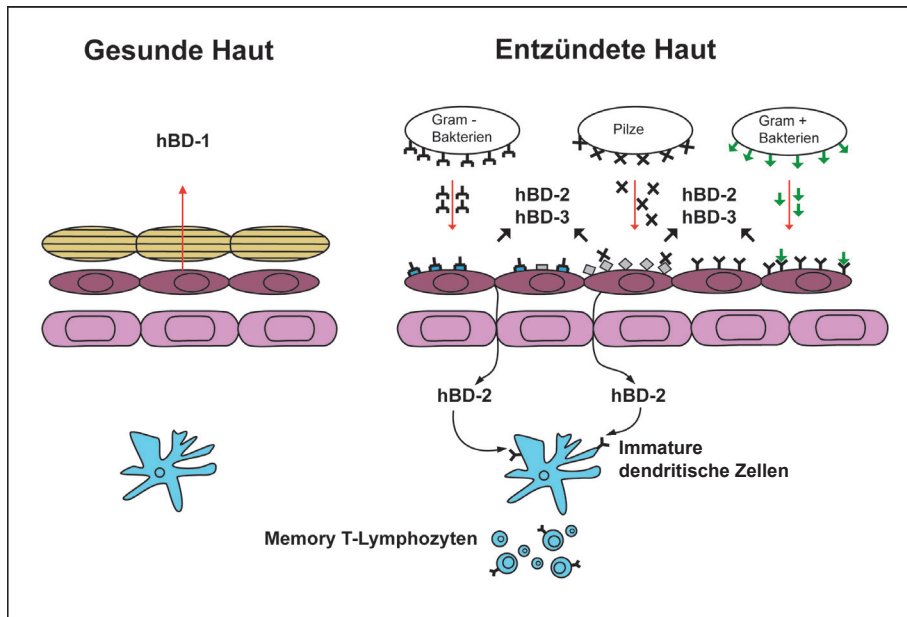


Abb. 1: Antimikrobielle Peptide: Effektormoleküle der Haut als Abwehrorgan. Hautarzt (2002) 53: 424–435. J. M. Schröder. Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Kiel (modifizierte Abbildung)

1.5 Die Gruppe der Defensine

Defensine gehören zu einer großen Gruppe antimikrobieller Peptide, die eine Untergruppe kationischer, amphipathischer Peptide bilden, die in humane alpha-, beta- und theta-Defensine unterteilt werden (Lehrer et al., 1999; Yang et al., 2002). Das wichtigste Merkmal der verschiedenen Unterklassen ist die jeweils variable Verknüpfung der intramolekularen Disulfidbrücken (Bals, 2000a).

a) alpha-Defensine

α -Defensine sind in den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere ubiquitär verbreitet und machen in diesen Zellen etwa 5–10 % der intrazellulären Proteine aus (Ganz et al., 1997). Das aus 90–95 Aminosäuren bestehende Präpropeptid wird posttranslational durch eine aminoterminalen Prozessierung zum aktiven Peptid umgewandelt (Valore et al., 1992). Im humanen System finden sich vier α -Defensine in neutrophilen Granulozyten (humanes neutrophiles Defensin (HNP) 1, 2, 3 und 4 (Ganz et al., 1985; Wilde et al., 1989) und zwei weitere (HD5 und HD6) in den intestinalen Paneth-Zellen (Jones und Bevins, 1992) sowie in den epithelialen Zellen der weiblichen Reproduktionsorgane (Quayle et al., 1998).

b) beta-Defensine

Die erstmals 1991 von Diamond et al. beschriebenen β -Defensine kommen bei Vögeln und Säugern in epithelialen Zellen und in Immunzellen epithelialer Gewebe vor.

Die aus 67–72 Aminosäuren bestehenden Precursor-Moleküle enthalten eine Signalsequenz und eine nachfolgende Proregion. Im humanen System gibt es vier verschiedene β -Defensine.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Expression von β -Defensinen, da diese eine wichtige Schlüsselfunktion bei der kutanen Immunität einnehmen. Die hauptsächlich von Epithelzellen produzierten β -Defensine vernichten direkt oder indirekt ein breites Spektrum an Bakterien, Pilzen und Viren. Auch wird immer deutlicher, dass diese Peptide nur nicht als endogene Antibiotika wirken, sondern auch weitere Funktionen erfüllen. Sie sind an der Regulierung von Entzündungs- und Immunreaktionen beteiligt, wirken als Chemoattraktantien auf immune oder entzündete Zellbereiche, sie beschleunigen die Angiogenese, fördern die Wundheilung und Reepithelisierung, binden und neutralisieren Lipopolysaccharide.

c) theta-Defensine

Eine neuartige Klasse der Defensine ist aus Rhesusaffen-Neutrophilen isoliert worden, diese wurden entsprechend ihrer kreisförmigen molekularen Struktur als θ -Defensine benannt (Tang et al., 1999).

1.5.1 Subtypen der humanen β -Defensine

hBD-1

hBD-1 wurde erstmals (Bensch et al., 1995) von einer Arbeitsgruppe des Peptid-Forschungsinstitutes in Hannover aus dem Plasma dialysepflichtiger Patienten isoliert. Die Expression von hBD-1 konnte anschließend auch in Keratinozyten der Haut (Schröder, 1999c), der Mundschleimhaut (Dunsche et al., 2002), des Urogenitaltraktes (Valore et al., 1998), des Gastrointestinaltraktes (Islam et al., 2001) und des Respirationstraktes gefunden werden (Harder et al., 1997).

hBD-1 wird konstitutiv produziert (Zhao et al., 1996, Krisanaprakornkit et al., 1998; Mathews et al., 1999).

hBD-1 zeichnet sich durch eine hohe Effektivität gegenüber gramnegativen Bakterien (z. B. *Escherichia coli*) aus, besitzt aber prinzipiell ein breites Wirkungsspektrum gegenüber einer Vielzahl von Bakterien und Pilzen (Tanida et al., 2003).

hBD-2

Die Isolation von hBD-2 gelang erstmals 1997 aus dermalen Keratinozyten von Patienten, die an Psoriasis litten (Harder et al., 1997). Während hBD-1 in den dermalen Epithelzellen konstitutiv exprimiert wird, wird die Expression von hBD-2 in den Epithelzellen der Haut und der Mundschleimhaut (Harder et al., 1997; Krisanaprakornkit et al., 2000; Liu et al., 2002) sowie im Respiration- und Verdauungstrakt (Schröder und Harder, 1999) durch die Zerstörung der Hautbarriere oder durch inflammatorische Prozesse induziert (de Jongh et al., 2005; Gambichler et al., 2008; Harder et al., 2010).

Die antimikrobielle Wirkung von hBD-2 erstreckt sich vor allem auf gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und die Hefe *Candida albicans*, nicht jedoch auf

grampositive Bakterien (Selleri et al. 2007). hBD-2 fördert den Widerstand gegen eine Infektion mit *P. aeruginosa* (Wu et al., 2009).

Verschiedene Untersuchungen (Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Sawasaki et al., 2002; Meyer et al., 2004; Schröder, 1999b und Harder et al., 1997) zeigten jedoch nur die Hemmung des Wachstums auf grampositive Erreger, wie das Bakterium *Staphylococcus aureus*. hBD-2 wird durch proinflammatorische Zytokine induziert, die in psoriatischer Haut verstärkt produziert werden (Harder und Schröder, 2005).

Ali et al. (2001) berichteten, dass hBD-1 und hBD-2 eine lokalisationsabhängige Expression in normaler menschlicher Haut aufwiesen. Es zeigte sich eine deutlich stärkere (100 %) Expression an exponierten Körperstellen, wie am Gesicht, an behaartem Kopf und an Fußsohlen, im Vergleich zu der an Brust und Abdomen (50 %).

hBD-3

2001 wurde hBD-3 zeitgleich von drei Arbeitsgruppen entdeckt (Garcia et al., 2001b; Harder et al., 2001; Jia et al., 2001) und in der Hornschicht der Haut und in den Epithelzellen der Mundhöhle nachgewiesen (Dunsche et al., 2002). hBD-3 wurde in den Epithelien vieler Organe gefunden, wie z. B. von Plazenta, Testis, Oesophagus und Trachea (Harder et al., 2001; Garcia et al., 2001b; Jia et al., 2001).

Das antimikrobielle Spektrum von hBD-3 umfasst sowohl potenziell pathogene grampositive Bakterien als auch gramnegative Bakterien und Hefepilze. Dabei wirkt hBD-3 im Gegensatz zu hBD-2 ebenso gegen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*. Insbesondere ist hBD-3 hochwirksam gegen multiresistenten *Staphylococcus aureus* (Harder et al., 2001; Kisich et al., 2007) und Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*. hBD-3 ist somit der Prototyp eines breitbandantimikrobiellen Peptids.

Die Expression von hBD-3 ist, ebenso wie die von hBD-2, durch verschiedene Stimuli induzierbar.

hBD-4

hBD-4 wurde durch Screening der Human-Genome-Databasis entdeckt (Garcia et al., 2001a). Ähnlich zu hBD-2 und -3 ist die hBD-4-Produktion durch inflammatorische Reize in Keratinozyten induzierbar, und zwar durch sogenannte PAMPs (pathogenassoziierte molekulare Muster) und durch Differenzierung (Harder et al., 2004). Synthetisches hBD-4 zeigte eine antimikrobielle Aktivität in Mikromolar-Konzentration gegen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus carnosus*. Dies impliziert eine Rolle dieses Peptids im angeborenen epidermalen Abwehrsystem gegen bakterielle Infektionen.

hBD-4 wurde im Respirationstrakt, in geringen Mengen in der menschlichen Haut, im Testikel, im gastrischen Antrum, in Neutrophilen, in der Schilddrüse und in der Niere nachgewiesen (Garcia et al., 2001a).

Tab. 1: β -Defensine

β -Defensine		Induzierbar	Antimikrobielles Spektrum		
			Gram + Bakt.	Gram – Bakt.	Pilze
hBD-1	Epithelien des Urogenitaltraktes und der Niere	Nein	+	+++	?
hBD-2	Epithelien der Haut und des Respirationstraktes	Ja	-	+++	++
hBD-3	Epithelien der Haut und des Respirationstraktes	Ja	+++	+++	+++
hBD-4	Epithelien des Respirationstraktes, im Testikel, im Antrum und in geringen Mengen in der Haut	Ja	+++	?	?

Die epithelialen induzierbaren β -Defensine weisen eine mehr oder weniger breite Wirksamkeit gegenüber verschiedenartigen Bakterien und Pilzen auf. Das Wirkungsspektrum der jeweiligen Vertreter ist jedoch unterschiedlich und offensichtlich eher selektiv hinsichtlich der auf den Epithelien physiologischerseits vorhandenen Mikroflora.

1.6 Mediatorfunktionen humaner β -Defensine

Defensine liefern laut Periathamby et al. (2002) eine kritische Verbindung zwischen dem angeborenen Immunsystem, das phylogenetisch alt ist, und der anpassungsfähigen Immunantwort, die nur in den Wirbeltieren gefunden wird.

Die Defensine können eine Schlüsselrolle bei der Verstärkung, Mobilisierung und Aktivierung der geeigneten anpassungsfähigen Effektorantwort spielen (Krutzik et al., 2001). Beispiele der stimulierenden Effekte von Defensinen auf die humoralen und zellvermittelten immunen Elemente veranschaulichen diese Verbindung (Fehlbaum et al., 2000; Krutzik et al., 2001).

Defensine benutzen multiple zelluläre Rezeptoren, wodurch sie in der Lage sind, die adaptive Immunabwehr gegen mikrobielle Invasoren zu leiten.

Neben ihrer antimikrobiellen Wirkung besitzen humane β -Defensine ähnlich Chemokinen und Zytokinen auch Mediatorfunktionen bei der angeborenen Immunantwort (Lehrer, 2004).

In vitro konnte ein chemotaktischer Einfluss von β -Defensinen auf die Rekrutierung von Monozyten, T-Gedächtniszellen (Yang et al., 1999), Mastzellen und neutrophilen Granulozyten dokumentiert werden (Niyonsaba et al., 2004). Bei der Degranulation von rekrutierten neutrophilen Granulozyten werden weitere Defensine freigesetzt und die Produktion proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-8) wird gesteigert. Die Effekte werden über einen „positiven Feedback Loop“ verstärkt (Yang et al., 2002). Nachgewiesenermaßen fördert hBD-2 die Freisetzung von Histamin und die Produktion von Prostaglandin D2 in Mastzellen (Befus et al., 1999; Niyonsaba et al., 2001).

Die Fähigkeit von Defensinen, auch Phagozytose, antientzündliche Mediatoren und eine Komplementaktivierung zu regulieren, unterstützt ihre Rolle bei der entzündlichen Wirtsabwehr gegen eine Mikrobeninvasion.

Zusätzlich zu ihrer hohen Konzentration kann die antimikrobielle Aktion der Defensine die synergistische Interaktion mit anderen Proteinen wie Laktoferrin erhöhen (Bals et al., 1998b).

Ein anderer Mechanismus, der in der Wirts-Krankheitserreger-Interaktion sehr wichtig sein kann, ist die direkte Deaktivierung oder das Freisetzen von Defensin durch Substanzen wie Dermatan-sulfat und α 2-Macroglobulin. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass dies eine Bindung an Defensine und eine komplette Neutralisation ihrer mikrobiziden Aktivität ergibt (Schmidtchen et al., 2001). Ähnlich können Defensin-Level aktiviertes α 2-Macroglobulin absenken. α 2-Macroglobulin ist die wichtigste Serumproteaseninhibitorkomponente, die sich bei Aktivierung an das Defensinpeptid bindet (Panuitch und Ganz, 1991).

Einige Defensine (bekannt als Corticostatine) (Salomon et al., 1991) opponieren aktiv mit dem adrenokortikotropen Hormon (ACTH) durch Bindung an ACTH-Rezeptoren, ohne es zu aktivieren (Tominaga et al., 1990). Diese Aktivität hemmt die Produktion des immunsuppressiven Cortisol und könnte daher bei der Antwort auf Infektionen nützlich sein. Die physiologische Rolle der In-vitro-Interaktion ist noch nicht erwiesen.

Genetische und pharmakologische Studien zeigen, dass hBD-3 als neutraler Melanocortin-Rezeptor-Antagonist fungiert, der entweder die Wirkung stimulierender Agonisten, wie die des Melanozyten-stimulierenden Hormons, oder die Wirkung hemmender inverser Agonisten blockieren kann (Nix et al., 2013). Semple et al. (2010) beschrieben, dass hBD-3 eine immunsuppressive Aktivität in vitro und in vivo zeigt. Dies impliziert eine doppelte Rolle des hBD-3 bei der antimikrobiellen Aktivität und Auflösung der Entzündung.

Des Weiteren konnte in Studien festgestellt werden, dass humane β -Defensine auch einen direkten Effekt auf Epithelzellen (Keratinocyten) in Bezug auf die Synthese immunmodulatorischer Botenstoffe erzeugen können. Hier konnte der Anstieg der Expression von Interleukin-6, -10 und -18 als unmittelbare Antwort auf die Anwesenheit humaner β -Defensine beobachtet werden (Niyonsaba et al., 2007).

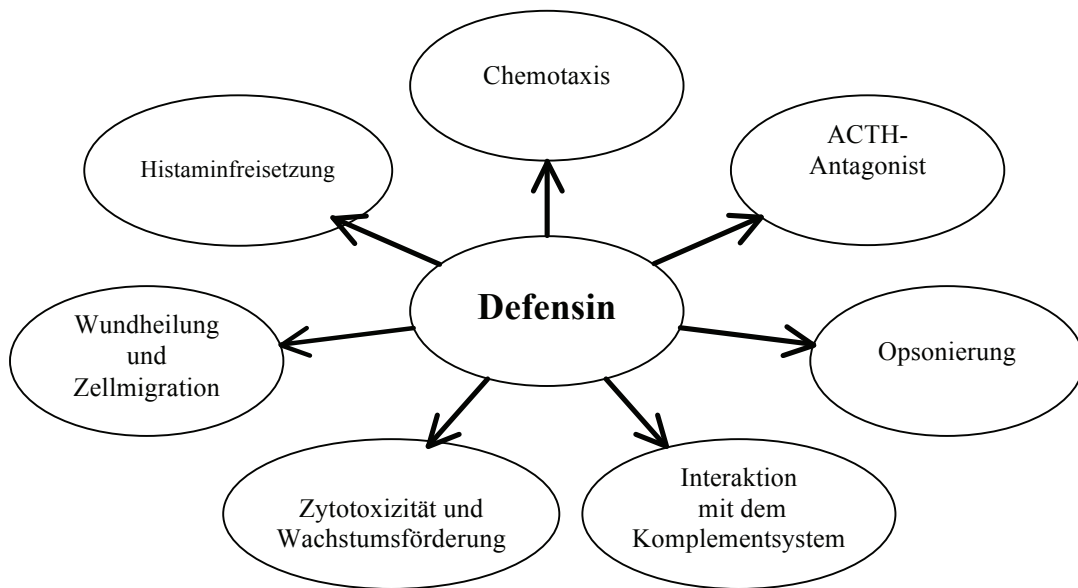


Abb. 2: Darstellung verschiedener Mediatorfunktionen humaner Defensine auf Gewebe und Zellen in Anlehnung an Lehrer (2004)

1.6.1 Die Mechanismen, durch die Defensine an der anpassungsfähigen (erworbenen) antimikrobiellen Immunität des Wirts teilnehmen

Die potenziellen Mechanismen, durch die β -Defensine die adaptive Immunabwehr verstärken (Yang et al., 2002), werden nachfolgend genannt.

In infiziertem Gewebe werden β -Defensine hauptsächlich durch Epithelzellen (Ep) einschließlich Keratinozyten und infiltrierende Neutrophile (N) produziert.

- a) Defensine erhöhen potenziell die Rekrutierung von unreifen dendritischen Zellen (iDCs) zu Standorten der Infektion.
- b) Defensine erleichtern die Antigen-Aufnahme durch Formen eines „Defensin-Antigen-Komplexes“ und das Targeting von Ag zu iDCs über eine Defensin-Rezeptor-induzierte Internalisierung.
- c) Außerdem können Defensine die Reifung von iDCs zu DCs direkt oder indirekt durch Induktion der Produktion von TNF und IL-1 fördern.
- d) Defensine können auch zur Effektorphase der adaptativen antimikrobiellen Immunität durch Erleichtern der Rekrutierung von Effektor-T-Zellen in infiziertes Gewebe beitragen.

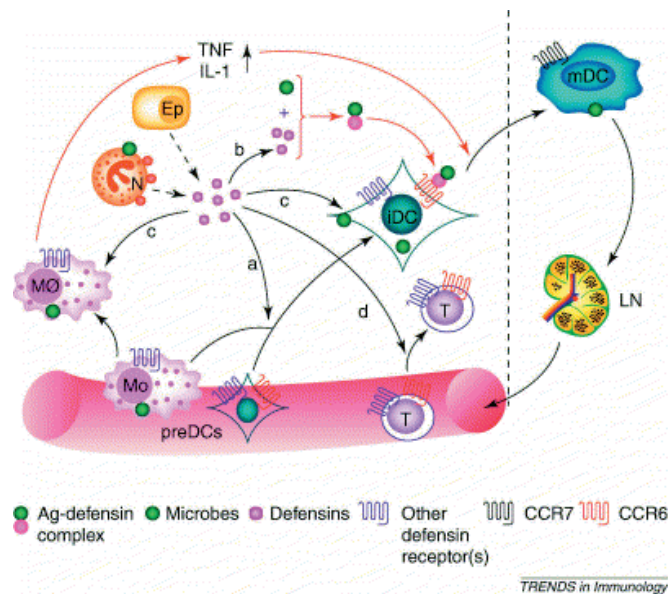


Abb. 3: Schematische Abbildung der potenziellen Mechanismen, durch die α - und β -Defensine die adaptive Immunität erhöhen. Chemokinrezeptor: (CCR6 und CCR7) Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle als immunologische Regulatoren für die Migration funktionell unterschiedlicher T- und B-Zellen sowie dendritischer Zellen in lymphatischen Organen. Immature dendritische Zellen: (iDC), mature dendritische Zellen: (mDC), Lymphknoten: (LN), Epithelzellen: (Ep). (Aus: Trends in Immunology 2002, Vol. 23)

1.6.2 Der antimikrobielle Mechanismus der β -Defensine

Der antimikrobielle Mechanismus der Defensine wird noch nicht eindeutig verstanden. Ihr Wirkungsmechanismus schließt die Unterbrechung von negativ geladenen Membranen ein, das Leck des zellularen Inhalts, das Kurzschließen des Protonengefälles und letztlich die Zerstörung der Zelle durch Osmolyse. Einige Mechanismen der antimikrobiellen Aktivität von Defensinen sind in der Vergangenheit postuliert worden. Diese schließen eine deutliche Porenformung (Fugii et al., 1993; Wimley et al., 1994) und lokale Oberflächenoligomerisation (Hoover et al., 2000; Maget-Dana et al., 1997) sowie eine nicht bestimmte elektrostatische Neutralisation und spannungsabhängige Ionentorsteuerung ein (Cociancich et al., 1993; Hristova et al., 1996; Merlin et al., 2001). Beweise zeigen, dass intrazelluläre Bestandteile auch an diesen Prozessen (Gera et al., 1991; Sharma et al., 2001) beteiligt werden.

Antimikrobielle Peptide, wie das Defensin einschließend, sind membranaktive Moleküle. Durch ihre Interaktion mit der zytoplasmatischen Membran können sie schwerwiegenden Schaden an Bakterien verursachen.

Anders scheint hingegen der Wirkmechanismus des hBD-3 bei *Staphylococcus aureus* zu sein. So findet man bei einer ultrastrukturellen Analyse nach zweistündiger Behandlung von *Staphylococcus aureus* mit hBD-3 ausgeprägte Zeichen einer Zellwandperforation, die auffallende Ähnlichkeiten zur Morphologie Penicillin-behandelter Staphylokokken aufweisen. Damit wäre es möglich, dass die

bakterizide Wirkung von hBD-3 und Penicillin in *Staphylococcus aureus* den gleichen Angriffsort betrifft. Gramnegative Erreger zeigen sowohl nach Behandlung mit hBD-2 als auch hBD-3 typische Zeichen einer Blasenbildung, wie sie auch bei ultrastrukturellen Analysen von gramnegativen Erregern gesehen werden, die mit anderen antimikrobiellen Peptiden behandelt wurden.

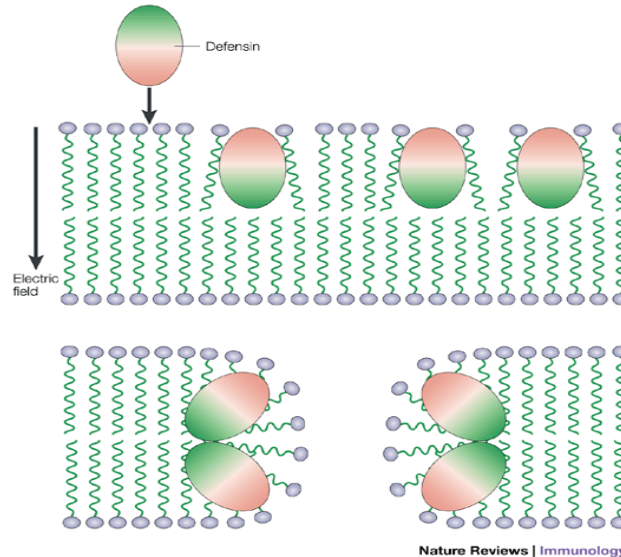


Abb. 4: Das Teppich-Wurmlochmodell der Aktion von Defensinen. Die meisten Defensine (erscheinen als lange Ovale) sind amphipathische Moleküle, die Gruppierungen der positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten (rosafarben) und der hydrophoben Aminosäure-Seitenketten (grün) haben. Dies erlaubt ihnen eine Interaktion mit mikrobiellen Membranen, hier schematisch gezeigt mit ihren negativ geladenen Phospholip-Hauptgruppen (blau) und hydrophoben Fettsäureketten (grün). In dem oberen Bild ziehen die elektrostatische Anziehung und das transmembranöse bioelektrische Feld das Peptid zur Membran. Die Peptidmoleküle sammeln sich wie in einem „Teppich“ an. (Aus: Reviews 2003, Vol. 3)

1.7 Die Bedeutung von Haarfollikeln als Barriereunterbrechung und Ort der Immunfunktion in menschlicher Haut

Hautanhangsgebilden kommt eine besondere Bedeutung in der Hautbarriere zu. Sie bilden natürliche Unterbrechungen der Hautbarriere. Drüsen und Haarfollikel sind häufig Ausgangspunkte für Entzündungen und Infektionen. Auch in Abwesenheit manifester Entzündung sind sie Orte einer intensiven Interaktion zwischen dem Wirtsgewebe, Umweltfaktoren und Pathogenen.

1.7.1 Der Aufbau des anagenen Haarfollikels

Die Oberhaut formt bei der Haarbildung längliche Einstülpungen, die bis tief in die Lederhaut reichen. Diese sogenannten Haarfollikel entstehen im Rahmen der Embryonalentwicklung aus Keratinozyten der Epidermis, wobei die Verbindung zu den Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide (ÄWS) des Haarfollikels auch in späteren Stadien der Haarentstehung bestehen bleibt (Moll et al., 1982; Holbrook et al., 1991; Schirren et al., 1997).

Die großen Terminalhaarfollikel, die jeweils ein 50–100 µm dickes Haar bilden, erstrecken sich bis in das untere Dermisdrittel, in vielen Fällen auch bis in die Subkutis.

Der intradermale Haarfollikel (Abb. 5) gliedert sich in eine bulbäre, suprabulbäre, zentrale und Isthmus-Region sowie in ein oberes Segment. In der bulbären Region findet der Hauptanteil der Proliferation statt. Das obere Segment mündet als sogenanntes Infundibulum in die Epidermis (apikal) ein.

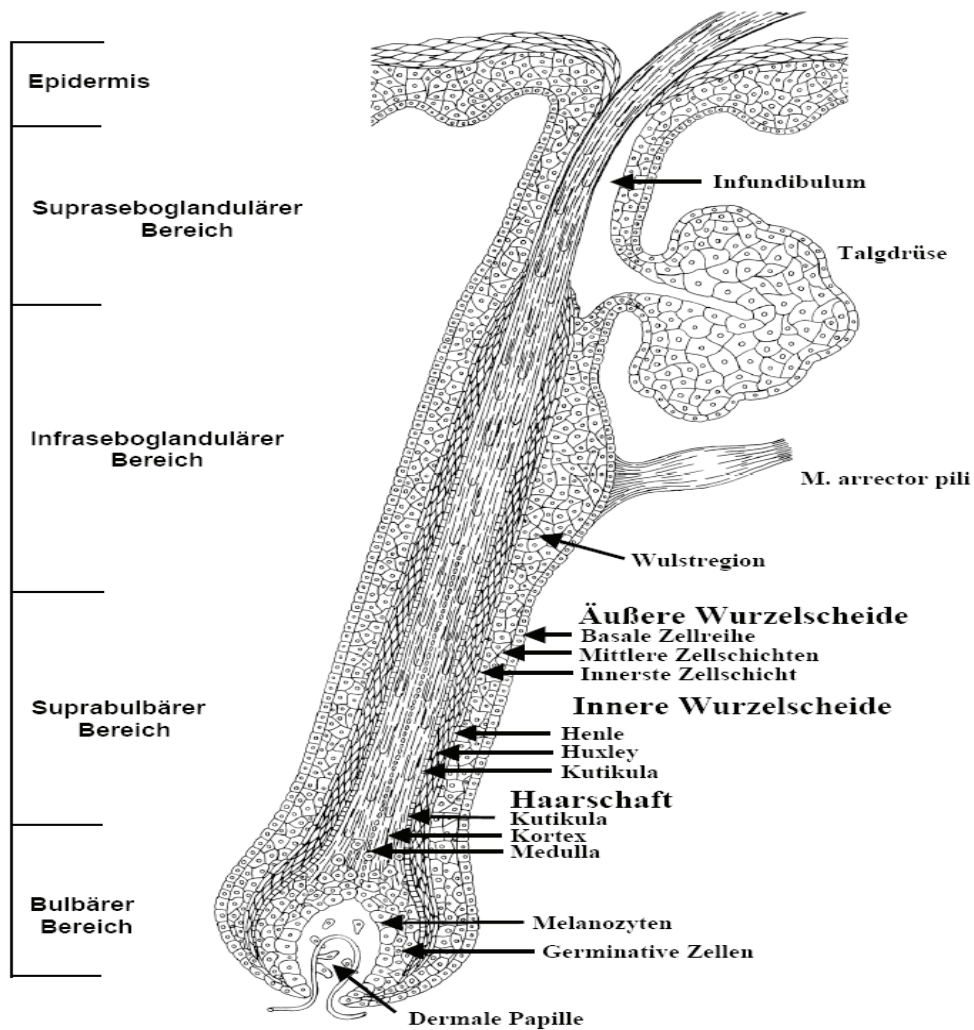


Abb. 5: Histomorphologischer Aufbau eines menschlichen Terminalhaarfollikels in seiner charakteristischen Gliederung. Zum Haarfollikel gehört ebenfalls die Talgdrüse, die das Sebum synthetisiert. Gemeinsam bilden sie mit der interfollikulären Epidermis die epidermale Haar-Talgdrüsen-Einheit (pilosebaceous unit).

1. Supraseboglandulärer Bereich (Infundibulum):

Das obere Segment des Haarfollikels zwischen der Einmündung der Talgdrüse in den Follikelkanal und dem Follikelostium wird als Infundibulum bezeichnet. Ab der Höhe der Talgdrüseneinmündung fehlt die innere Haarwurzelscheide.

In diesem Segment des Haarkanals ist der keratinisierte Haarschaft von residenten Mikroorganismen (z. B. *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium spec.*, *Malassezia spec.* und gegebenenfalls *Demodex folliculorum*) besiedelt. Beeinträchtigungen des mikrobiellen Gleichgewichts und die Ansiedelung pathogener Keime können entzündliche Follikulitiden zur Folge haben.

2. Die Talgdrüsen

Die mit dem Haarfollikel assoziierten Talgdrüsen der Haut und die interfollikuläre Epidermis stellen eine funktionale Einheit dar, die als epidermale Haar-Talgdrüsen-Einheit (pilosebaceous unit) bezeichnet wird (Blanpain, 2009). Nicht mit Haarfollikeln assoziierte Talgdrüsen werden freie Talgdrüsen genannt.

3. Isthmusbereich

Der mittlere Abschnitt des Haarfollikels, der sich zwischen der Einmündung der Talgdrüse und der Insertion des Musculus arrector pili befindet, bildet den sogenannten Isthmus. Der Bereich des Isthmus schließt auch die Verdickung der äußeren Wurzelscheide mit ein, die als Wulstregion bezeichnet wird. Diese spielt beim Haarwachstum eine dominante Rolle, da sich in ihr vermutlich die epithelialen Stammzellen des Haarfollikels befinden. Spezialisierte Fibroblasten der dermalen Haarpapille senden Signale an diese Stammzellen und steuern deren Regeneration während der Haarzyklen.

Die Talgdrüse sezerniert Lipide in den Haarkanal, die über den Haarschaft zur Hautoberfläche gelangen und dort den Sebumgehalt von Kopfhaut und Haar beeinflussen. Bei Schreck- und Kältereizen bewirkt der Musculus arrector pili ein Aufrichten des Haares, was als Gänsehaut-Phänomen bezeichnet wird (Panteleyev et al., 2000a).

4. Infraseboglandulärer Bereich

Der infraseboglanduläre Bereich ist ein Segment zwischen der Haarwurzel und dem Musculus arrector pili.

5. Der Haarschaft, die Haarwurzel und die Haarwurzelscheide

Der Haarfollikel lässt sich in den Haarschaft, die Haarwurzel (Bulbus) und die Haarwurzelscheide untergliedern (Abb. 5).

Haarschaft

Der aus der Haut herausragende Teil des Haarfollikels (Haarschaft) besteht aus der Haarrinde (Kortex) und dem Haarmark (Medulla). Der Kortex wird von ausdifferenzierten keratinisierten

Haarmatrixzellen gebildet. Die röhrenförmige Medulla ist ein mit Luft gefüllter Hohlraum, der nur beim Terminalhaar existiert.

Überlappende Kutikularzellen bilden die äußerste Schicht des Haares (Kutikula), welche die Haarrinde vollständig bedeckt.

Haarwurzel

Der Bulbus (Haarwurzel) wird in die Haarmatrix und die mesenchymale Haarpapille unterteilt. Letztere ist ein gefäßreiches Bindegewebe, das die Haarmatrix mit Nährstoffen versorgt (Stenn und Paus, 2001). Die epithelial-mesenchymale Interaktion während des Haarzyklus wird durch die dermale Papille gesteuert. Diese mesenchymale Komponente der Haarwurzel gilt als Steuerungszentrale des Haarfollikels (Jahoda und Oliver, 1990; Oliver, 1991). Der Haarschaft geht aus der mitotisch aktiven Haarmatrix hervor, die eines der am schnellsten proliferierenden Gewebe des Körpers darstellt (van Scott et al., 1963). Beim Wachstum des Haarschaftes wird das von angrenzenden, dendritisch verzweigten Melanozyten synthetisierte Pigment Melanin in das Zytoplasma der Haarzellen aufgenommen.

Als unteres Ende des Haarfollikels reicht die Haarwurzel unterhalb der Hautoberfläche bis 1–3 mm tief in das subkutane Fettgewebe hinein.

Haarwurzelscheide

Die innere und die äußere epitheliale Haarwurzelscheide umschließen den Haarfollikel auf seiner gesamten Länge. Die innere Haarwurzelscheide lässt sich von außen nach innen in die äußere Henle-Schicht, die mittlere Huxley-Schicht und die Kutikula unterteilen. Diese drei Schichten werden von sich am äußeren Rand befindlichen Matrixzellen gebildet.

Die sich vom Bulbus bis zum Infundibulum erstreckende und dabei zunehmend dicker werdende innere Wurzelscheide besitzt als strukturgebendes Element eine stützende und formende Funktion für den Haarschaft. Die IWS endet auf der Höhe des Einschubs des Talgdrüsenkanals, da dessen Sekretionsprodukte ausschlaggebend für eine geordnete Abscheidung und Trennung von Hülle und Schaft sind (Paus et al., 2008; Stenn und Paus, 2001).

Die von Epithelzellen abstammende äußere Wurzelscheide, welche die äußerste Schicht des Haarfollikels bildet, ist auf der Höhe des Bulbus am dünnsten und verdickt sich zunehmend zum Isthmus hin. In Ansatzhöhe des Musculus arrector pili verdickt sich die äußere Wurzelscheide zum sogenannten Wulst. In dieser Wulstregion werden die epithelialen Stammzellen des Haarfollikels vermutet (Lavker et al., 1993; Akiyama et al., 1996; Taylor et al., 2000; Kloepper et al., 2008; Tiede et al., 2007).

Beim Haarfollikel lässt sich funktionell ein permanenter und ein transientser Bereich unterscheiden. Der permanente Abschnitt, der durch den Haarzyklus nicht morphologisch verändert wird, umfasst den Bereich vom Follikelostium bis zur Wulstregion. Der transiente Abschnitt des Haarfollikels besteht aus dem bulbären Bereich mit der dermalen Papille, den angrenzenden Melanozyten, den Matrixzellen und den germinativen Zellen. Im Gegensatz zum transienten Abschnitt sind in diesem Bereich profunde Veränderungen während des Haarzyklus detektierbar (Parakkal, 1990).

In jedem Haarfollikel (HF) wechseln sich periodisch wiederkehrende Phasen massiver Proliferation bzw. terminaler Differenzierung (Anagen), Organrückbildung (Katagen) und Ruhestadium (Telogen) ab (Chase und Eaton, 1959; Paus, 1996).

Die eigentliche Haarproduktion findet in der Wachstumsphase statt. Beim Aufbau und bei der Reifung des Haarfollikels spielen die Zellen der Wulstregion eine bedeutende Rolle. Im voll entwickelten Follikel produzieren proliferierende epitheliale Zellen das Haar. Diese Wachstumsphase wird in sechs, histologisch und hinsichtlich der Produktivität unterschiedliche Stadien unterteilt (Anagen I–VI).

Während des darauf folgenden Katagens, der Rückbildungsphase, kommt es zum Proliferationsstopp der Keratinozyten der Haarmatrix und die Melanozyten beenden die Produktion von Melaningranula. Das Wachstum des Haares kommt zum Stillstand. In den epithelialen Anteilen des Haarfollikels (ausgenommen der Stammzellregion) kommt es zu streng regulierten Rückbildungsvorgängen, bei denen der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle spielt. Gegen Ende des Katagens verkleinert sich die dermale Papille, sie bewegt sich aufwärts und kommt nahe der Wulstregion zum Stillstand. Auch das Katagen kann nach histologischen Kriterien in weitere Unterstadien (Katagen I–VIII) eingeteilt werden.

Im auf die Phase der Rückbildung (Katagen) folgenden Ruhestadium (Telogen) bildet sich am proximalen Ende des Haares eine Verdickung, die als Kolbenhaar bezeichnet wird. Nach dem mechanisch bedingten Verlust des Kolbenhaares (z. B. durch Bürsten oder Waschen) beginnt der Zyklus mit dem Anagen von vorn (Straile et al., 1961; Paus 1996; Panteleyev et al., 2000b).

Die Länge der einzelnen Phasen (Anagen, Katagen, Telogen) im Follikelapparat ist variabel. Anders als bei einigen Tierarten (z. B. Mausern) finden die Prozesse beim Menschen in verschiedenen Haarfollikeln nicht synchron statt. Das Anagen umfasst als längstes Stadium beim Menschen eine Zeitspanne von zwei bis fünf Jahren, das Katagen etwa fünf Wochen und das Telogen etwa fünf Monate. Die Dauer der anagenen Phase ist ausschlaggebend für die maximale Länge des Haares.

1.7.2 Terminalhaarfollikel (THF)

Der Terminalhaarfollikel produziert ein derbes, mark- und pigmenthaltiges und im Mittel zwischen 50–100 µm durchmessendes Haar. Es kann bezüglich seiner Länge um mehr als 1 cm variieren und den Follikelkanal fast vollständig ausfüllen. Die Länge des Terminalhaars setzt sich durch Rate und Dauer der Wachstumsphase fest (Whiting, 2001). Der Durchmesser bleibt während einer einzigen Wachstumsphase unter normalen Konditionen uniform.

Seitlich ist im Bereich der Wulstregion der äußeren Wurzelscheide, die sich häufig nicht besonders ausgeprägt darstellt, der Musculus arrector pili angeheftet. Etwas darüber münden die im Verhältnis zur Follikelgröße kleinen Talgdrüsen seitlich in den langen Follikelkanal ein.

Die Wurzelscheide (Phase Anagen) der Terminalhaarfollikel reicht bis in die Subkutis oder tiefere Dermis. In der Wachstumsphase (Anagen) nimmt der HF normalerweise eine solide zylindrische Form ein (Abb. 5).

1.7.3 Vellushaarfollikel (VHF)

Der Vellushaarfollikel ist kurz, fein, dünn, leicht pigmentiert oder pigmentlos, sehr kurz und meist nicht länger als 2 cm (Headington, 1984) und normalerweise ohne Medulla (Serri und Cerimele, 1990; Blume-Peytavi et al., 1991) (Abb. 6). Ein VHF wird als kleiner Follikel definiert. Er reicht im Gegensatz zum Terminalhaarfollikel nur bis in die obere Schicht der mittleren Dermis.

VHF wachsen gleichmäßig über das gesamte Integument verteilt, eine Ausnahme bilden lediglich die Handteller und Fußsohlen.

Im Bereich des Isthmus ist die mehrlagige innere Wurzelscheide besonders ausgeprägt und fast genauso breit wie im Terminalhaarfollikel. Der Follikel befindet sich in einem Bereich mit hoher seborrhöischer Aktivität. Auffallend sind die disproportional großen Talgdrüsen (Kligman, 2000), die den Follikel oft in der gesamten Zirkumferenz umgeben. Die epitheliale Haube auf der Ebene der Einmündung des Talgdrüsenausführungsganges zeigt eine rock- oder schürzenartige Konfiguration (Narisawa et al., 1993).

Der Bereich des Wulstes ist im anagenen VHF meist stärker als im Terminalhaarfollikel ausgebildet (Narisawa et al., 1994).

Der infraseboglanduläre Abschnitt ist meist relativ kurz. Ein Musculus arrector pili muss nicht angegliedert sein (Uno, 1986). Untersuchungen von Narisawa et al. (1993) zeigten jedoch, dass der Musculus arrector pili den Vellushaarfollikel in der gesamten Zirkumferenz umgeben kann, im Gegensatz zum THF weist er unterschiedliche Formen auf.

Mit Reife und Belastung durch Androgene wechseln regionale menschliche Haarfollikel ihre Morphologie in den Terminalfollikeln und produzieren einen Terminalhaarschaft.

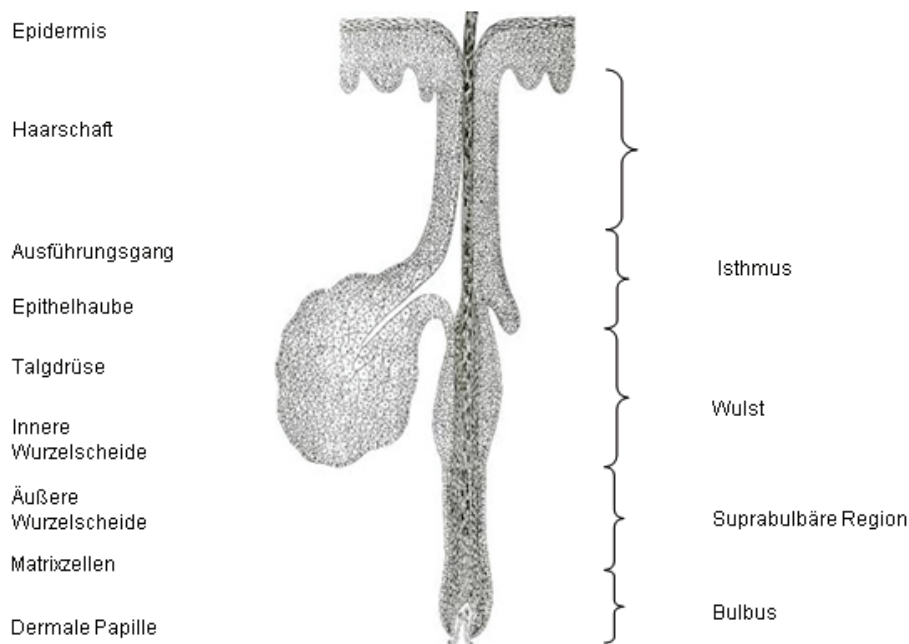


Abb. 6: Schematischer Aufbau des VHF

1.7.4 Der Intermediärhaarfollikel

Der Intermediärhaarfollikel weist eine Morphologie zwischen Terminal- und Vellushaarfollikel sowie ein transitorisches Stadium (Whiting, 2000) auf. Intermediärhaarfollikel sind marklos und beinhalten eine gemäßigte Anzahl von Pigmenten, etwas weniger als im Terminalhaar. Sie reichen maximal bis in die Höhe der ekkrinen Schweißdrüsenknäuel (Uno, 1986).

1.7.5 Haare als besondere Strukturen innerhalb der Barriere

Die Epidermis grenzt an die äußere Wurzelscheide des Haarfollikels an. Dieser besteht aus einer komplizierten Struktur, die eine Haarschaftherstellung bildet (Lavker et al., 1999), insbesondere in der äußeren Wurzelscheide wird jedoch auch eine Vielzahl regulatorischer Mediatoren gebildet. Das Ausmaß der zellulären Interaktion zwischen der Epidermis und den Haarfollikeln ist bisher nicht im Detail erforscht.

Der Haarfollikel stellt eine Unterbrechung der kontinuierlichen Barriere der Haut dar. Dadurch stehen insbesondere das Haarfollikelostium und die distale äußere Wurzelscheide in direktem Kontakt mit der Außenwelt und stellen eine Haupteintrittspforte der meisten pathogenen Erreger dar (Abb. 7). Dennoch ist der Haarfollikel wesentlich komplexer als nur eine einfache Unterbrechung der Epidermis. Er setzt sich aus zahlreichen unterschiedlich differenzierten und damit unterschiedliche Funktionen erfüllenden epithelialen Zellen zusammen. Sie scheinen somit eine der immunologischen Schlüsselregionen zu sein.

Der Follikulärkanal beim Säugertier ist aufgrund seiner Breite, aufgrund der Lage der distalen ÄWS des Haarfollikels und des pilosebazeösen Ganges, der den Haupteingang für Mikrobeninvasionen beim Menschen und eine reiche Wohnmikroflora bildet, besonders empfindlich für mikrobielle Angriffe.

Diese pilosebazeöse Einheit muss ein komplexes Wirtabwehrsystem zum Schutz dieser besonderen Haarstrukturen besitzen, das die inflammatorischen und immunologischen Antworten zur Kontrolle der Residentmikroflora gibt.

Einige Forscher spekulieren, dass Toxine und mikrobielle Stoffwechselprodukte oder Antigene in die Erzeugung der entzündlichen Antwort mit einbezogen werden könnten.

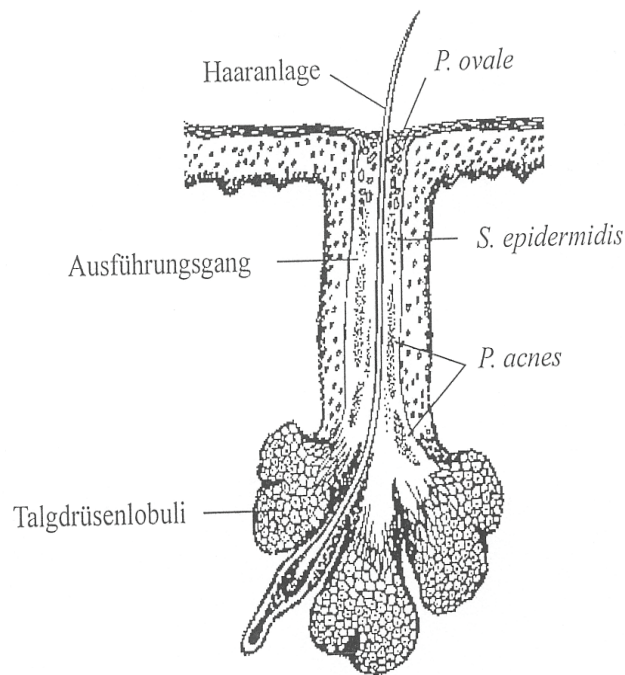


Abb. 7: Verteilung der physiologischen Mikroflora im Haarfollikel (aus: Wolff und Plewig, 1976)

1.7.6 Besiedlungen der Haarfollikel

Die Bakterien gesunder menschlicher Haut bilden Mikrokolonien (Somerville und Noble, 1973; Grice und Segre, 2011). Der überwiegende Teil der Residentflora befindet sich auf und zwischen den Schichten des Stratum corneum sowie in den oberen Bereichen der Haarfollikel und Ausführungsgänge der Talgdrüsen (Röckl und Müller, 1959; Noble, 1968; Leeming et al., 1984).

Haarfollikel als Keimreservoir

Der Bereich der Haarfollikel beherbergt den Hauptteil der Hautflora, nur etwa 20 % der Mikroorganismen lassen sich in tieferen Hautschichten ($> 0,3$ mm) nachweisen (Baxby und Woodroffe, 1965).

Die Verteilung und Dichte der pilosebazeösen Einheit ist für die regionalen Unterschiede in der Flora von Bedeutung, da der Haarfollikel der Ort der größten Konzentrationen von Mikroorganismen in der Haut ist (McBride, 1993). Sie stellen eine besondere physikochemische Umgebung mit einer zur übrigen Haut unterschiedlichen pH- und Sauerstoffspannung dar. Die häufigsten Organismen sind *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus* spp., *Demodex* und *Malassezia furfur*, die auf der menschlichen Kopfhaut in einer hohen Besiedlungsdichte vorkommen (Wolff und Plewig, 1976; McBride, 1993; Lange-Asschenfeldt et al., 2011).

Die lipophile Hefen, die sich in den Öffnungen der Haarfollikel befinden, werden in *Pityrosporum ovale* und in *Pityrosporum orbiculare* unterteilt. Sie stellen einen Komplex von Organismen dar und sind als *Malassezia furfur* sowie andere Arten von *Malassezia spp* reklassifiziert worden (Faergemann et al., 1983). *Staphylococcus* und *Micrococcus* sind Aerobier; folglich ist ihr Wachstumsort innerhalb der sebazeösen Einheit oberflächlich. Diese Organismen sind nicht im Stande, unter den anaeroben Bedingungen des Infra-Infundibulum zu bestehen, in dem die entzündliche Reaktion bei der Akne auftritt. Die anaerob wachsenden *Propionibacterium* wurden rund um die Öffnung der Talgdrüsen sowie proximal lokalisiert (Leeming et al., 1984).

In den Haarfollikeln der Kopfhaut und auf der Kopfhaut sowie im Bereich der Stirn finden sich Haarbalmilben, beispielsweise die bewirteten *Demodex folliculorum*, die jedoch normalerweise keine Krankheiten verursachen (Brooke, 1999).

1.7.7 Haarfollikel und Immunfunktion

Der Haarfollikel ist mit einem sehr effizienten Immunsystem ausgestattet. Da das Infektionsrisiko in den am meisten distal befindlichen Arealen des Haarfollikels am höchsten ist, sind die Abwehrsysteme hier am differenziertesten ausgeprägt.

Folglich kann in der distalen ÄWS ein dichtes, ringförmiges Netz interagierender Langerhans- und T-Zellen sowie eine große Anzahl perifollikulärer Mastzellen und Makrophagen identifiziert werden (Christoph et al., 2000).

Der Haarfollikel hat ein ausgeprägtes Immunsystem (Paus, 1997), dieses zeigt erhebliche Unterschiede zum extrafollikulären Hautimmunsystem (Bos, 1997) und durchläuft wesentliche, mit dem Haarzyklus verbundene Anpassungen (Paus, 1998).

Die Immunologie des Haarfollikels (Abb. 8) in Verbindung mit dem Hautimmunsystem ist biologisch faszinierend und nimmt eine besondere Rolle bei der Abwehr von Haarkrankheiten ein.

Der Follikelkanal, das Infundibulum und die Talgdrüse sind bevorzugte Kanäle für das Eindringen vieler pathogener Organismen. Deswegen muss das pilosebazeöse Areal über ein komplexes Abwehrsystem verfügen, über das entzündliche und immunologische Antworten auf die ansässige Mikroflora kontrolliert werden können (Böhm und Luger, 1998).

Die distalen Teile der menschlichen Haarfollikel bilden einen sehr effektiven, spezialisierten Bestandteil des Immunsystems und somit auch des gesamten Hautimmunsystems. Hier werden interagierende intraepitheliale Langerhanszellen, T-Zellen und perifollikuläre Makrophagen generiert (Paus, 1997; Paus et al., 1999; Christoph et al., 2000). Diese sind auf die mikrobielle antigene Erkennung und Präsentation spezialisiert (Paus et al., 1994b, 1998 und 1999) und bilden ein besonders wirksames Antiinfektions-Abwehrsystem (Paus, 1994a; Rückert, 1998).

Der Haarfollikel verfügt über mehrere faszinierende, unterschiedliche immunologische Merkmale, zum Beispiel werden die epidermalen dendritischen T-Zellen im Epithelium des Maus-Haarfollikels nur in einem definierten Sektor der distalen äußeren Wurzelscheide gefunden. Im Gegensatz dazu weist die Epidermis eine homogene Verteilung von intraepithelialen Lymphozyten auf (Paus et al., 1994b).

Darüber hinaus bildet der Haarfollikel ein Reservoir für dendritische Zellen, von dem aus folliculäre Langerhanszellen zur Repopulation UVB-exponierter Epidermis beitragen können (Gilliam et al., 1998).

Zudem sind die distale äußere Wurzelscheide und der pilosebazeöse Gang charakteristisch für immunologische Aktivitäten (Abb. 8), wie z. B. die klassische und nicht klassische Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Kategorie I und der interzellulären Adhäsions-Molekül-1-Expression (ICAM-1).

Die Innenwurzelscheide (IWS), die Haarmatrix anagener Follikel und unterhalb der Stufe der Talgdrüse – außer in einigen Zellen der äußeren Wurzelscheide – zeigen praktisch keine Moleküle der MHC Klasse Ia (Harrist et al., 1983; Westgate et al., 1991; Paus et al., 1994a), so dass das proximal anagene Follikelepithelium eine gewisse Form von „Immunprivileg“ (IP) genießt (Billingham und Silvers, 1971; Westgate et al., 1991; Paus et al., 1994a, 1994c; Paus, 1997). Während der Zurückentwicklung in die katagene Wachstumsphase exprimieren sie MHC Klasse I auf dem gesamten Follikelepithelium. Eine große Anzahl aktivierter Makrophagen ist um den Follikel zu finden; dies legt nahe, dass der anagene Follikel ein immunologisch privilegiertes Gewebe ist (Westgate et al., 1991).

Im Gegensatz zu der hohen Dichte antigenpräsentierender Zellen im oberflächennahen Bereich des Haarfollikels sind die reduzierten Expressionen von MHC-I-Molekülen und eine deutlich reduzierte Zahl von T-Zellen und Langerhanszellen charakteristisch für den anagenen Haarbulbus (Christoph et al., 2000).

Neuere Studien zu den postulierten epithelialen Haarfollikel-Stammzellen deuten auf die Existenz eines zweiten IP in der Wulstregion des Haarfollikels hin, das die dort vorkommenden Stammzellen schützt (Meyer et al., 2007). Die Wulstregion und die anagene Haarwurzel zeigen unterschiedliche Charakteristika: Die Expression von MHC Klasse I-, Klasse II- und β 2-Mikroglobulin-Molekülen ist in der Wulstregion im Vergleich zur Haarwurzel erhöht. Diese Befunde lassen vermuten, dass in der Wulstregion eher als im Bereich der Haarwurzel eine Immunreaktion ausgelöst werden kann. Inflammatorische Attacken auf epitheliale Stammzellen in der Wulstregion können diese zerstören (Meyer et al., 2008).

Abnormitäten oder Funktionsstörungen des Immunsystems des Haarfollikels können ein sehr häufiges Auftreten von Haarerkrankungen, z. B. von Follikulitis bei immunschwachen Patienten, erklären.

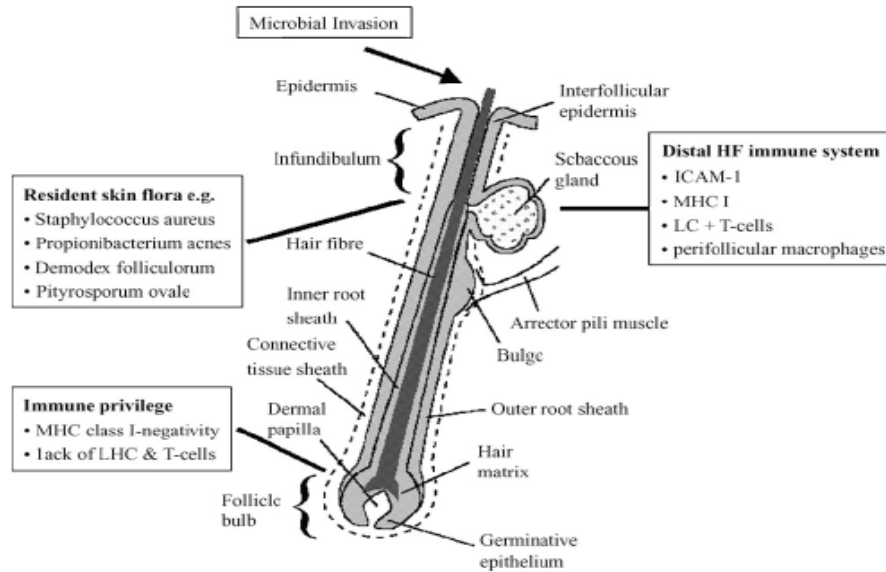


Abb. 8: Schematische Darstellung der Immunologie des Haarfollikels (aus: Chronnell, 2003)

1.7.8 β -Defensine im Haarfollikel

Eine Expression von hBD-1 wurde in den Haarfollikeln der Meatushaut beschrieben (Bøe et al., 1999). Auch in verbrannter Haut, in der die Keratinozyten zerstört wurden, war eine menschliche hBD-1-Expression in den glandulären Hautstrukturen einschließlich Haarschaft nachweisbar (Poindexter, 2005). Bøe et al. (1999) fanden eine markierte Expression von hBD-1 in der Talgdrüse. hBD-2 wurde in Haarfollikeln und in den Acini der Sweat-Schweißdrüse entdeckt (Milner et al., 2004). Bürkle (2011) berichtete, dass hBD-2 am häufigsten in den Haarfollikeln (schwach bis mäßig) war und hBD-3 sich am Haarfollikel negativ nachweisen ließ.

Chronnell et al. (2001) haben in allen suprabasalen Schichten der Epidermis, dem distalen Teil des Haarfollikels (Haarkanal, pilosebazeöser Gang und interfollikulärer Epithel), eine starke Immunreaktivität (IR) von hBD-1- und hBD-2-Expressionen gefunden.

Eine starke Expression von hBD-1 wurde auch in der weniger differenzierten proximalen IWS und im pilosebazeösen Kanal ausgemacht. Außerdem wurde eine hBD-2-Expression in den suprabasalen Schichten der proximalen ÄWS und im pilosebazeösen Kanal identifiziert (Philpott, 2003).

Schwächere hBD-1- und hBD-2-IR waren in den zentralen und proximalen Regionen der ÄWS sowie im proximalen Teil der IWS exprimiert, während kein hBD-1 oder hBD-2-IR in der Haarmatrix oder in den dermalen Papillen ermittelt wurde (Chronnell et al., 2001).

hBD-1 und hBD-2 wurden in der basalen Schicht der zentralen äußeren Wurzelscheide einschließlich der Wulstregion und im Isthmus exprimiert. Dagegen zeigte die distale ÄWS nur in den oberen suprabasalen Schichten starke Expressionen von hBD-1 und hBD-2 (Chronnell et al., 2001; Ali et al., 2001).

Im periläsionalen Follikel gibt es hinsichtlich hBD-1 und hBD-2 deutlich unterschiedliche Expressionen: Eine erhöhte Expression von hBD-1 ist auf die IWS des Follikels beschränkt, während die von hBD-2 stark im proximalen Follikel erhöht ist. Im Gegensatz zum läsionalen und periläsionalen Epithel der Akne zeigten hBD-1 und hBD-2 in gesunden Haarfollikeln lediglich eine geringe Expression in der proximalen äußeren und in der inneren Haarwurzelscheide (Philpott, 2003).

Takahashi et al. (2004) zeigten, dass durch hBD-2 eine schwache Immunreaktivität in der ÄWS exprimiert wurde. Je nachdem, welcher der Toll-like-Rezeptor (TLR)-Agonisten zur Stimulation verwendet wurde, veränderten sich die Färbungsmuster a) im IWS und in der inneren Schicht der ÄWS (TLR2) oder b) sehr stark in den Umhüllungen der Haarfollikel, im Haarschaft und sogar in den Fibroblasten der dermalen Papille (TLR4) oder c) im proximalen und mittleren Teil sowohl des IWS als auch des ÄWS (TLR5). Bakterizides, die Permeabilität erhöhendes Protein wurde außer auf menschlichem Haarfollikel in der Henle- und Huxley-Schicht von Haarfollikeln bei Ratten identifiziert.

1.8 Zielsetzung/Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, β -Defensine im Haarfollikel zu lokalisieren sowie deren dortige mögliche Funktionen zu bestimmen.

Der Haarfollikel stellt eine Unterbrechung der kontinuierlichen Barriere der Haut dar.

Hier findet sich eine „biochemische Barriere“, die durch die Produktion antimikrobieller Peptide in den Hautschichten und in den Haarfollikeln gekennzeichnet ist.

Die Gruppe der humanen β -Defensine wurde als für den Schutz der Hautbarriere, der Haarfollikel und insbesondere des pilosebazeösen Ganges (Haupteingang als Ort des permanenten Kontakts mit Mikroorganismen) relevante antimikrobielle Peptide beschrieben.

Die exakte Expression der menschlichen β -Defensine in den Haarfollikeln ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

Eine Rolle der β -Defensine bei der Barrierefunktion der Haut setzt ihre Kontinuität in den Hautanhangsgebilden, z. B. in Haarfollikeln, voraus. Um die These, dass β -Defensine auch in den menschlichen Haarfollikeln eine Rolle bei der Barrierefunktion spielen, weiter zu erhärten, sollen die Expression und die Verteilung der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Haarfollikeln näher betrachtet werden. Darüber hinaus würden β -Defensine im Haarfollikel andere Funktionen erfüllen, die denen eines Immunmodulators entsprechen.

In dieser Arbeit werden Haarfollikel-Hautschnitte anhand der Immunhistochemie- und Immunfluoreszenz-Methode hinsichtlich der Expression verschiedener β -Defensine (hBD-1, hBD-2 und hBD-3) untersucht und unterschiedliche β -Defensine in den verschiedenen Bereichen des Haarfollikels bestimmt und geprüft.

In einer weiteren Forschungsstudie könnte z. B. untersucht werden, welche Rolle β -Defensine bei infektiösen sowie immunologischen Haarerkrankungen spielen. Es wäre auch möglich zu untersuchen, ob und wie β -Defensine im menschlichen Haarfollikel durch mikrobielle Produkte wie Lipopolysaccharide (LPS) stimuliert werden. Außerdem könnte erforscht werden, ob und wie das proinflammatorische Zytokin Interferon- γ (IFN) die Expression unterschiedlicher β -Defensine im menschlichen Haarfollikel beeinflusst.

Fragestellung:

Es ergeben sich die folgenden Fragestellungen, denen in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit im Einzelnen nachgegangen werden soll.

- Wird β -Defensin hBD-1, hBD-2 und hBD-3 auch im Haarfollikel exprimiert und wie ist deren exaktes Expressionmuster?
- Wie ist die Expression von β -Defensin hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaarfollikel?
- Wie ist die Expression von β -Defensin hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Intermediärhaarfollikel?
- Wie ist die Expression von β -Defensin hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaarfollikel?
- In welchem Bereich des Haarfollikels finden sich die höchsten Konzentrationen der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3?
- Welche unterschiedlichen Expressionen gibt es für jedes β -Defensin im Haarfollikel?
- Gibt es eine unterschiedliche Expression von β -Defensin in verschiedenen Haartypen?
- Gibt es eine unterschiedliche Expression von β -Defensin im Haarfollikel bei verschiedenen Altersstufen oder zwischen den Geschlechtern?
- Welche Relevanz haben die β -Defensine im Haarimmunsystem?

2 Material und Methoden

Es handelt sich um eine explorative, experimentelle Studie zur Identifizierung von Zielantigenen, die für die Regulation des Haarzyklus und die Entwicklung neuartiger Haartherapien interessant sein könnten.

Untersucht wurden Kopfhautproben gesunder Probanden, die sich plastisch-chirurgischen Eingriffen unterzogen (z. B. Facelifting). Hierdurch war es möglich, Vellus- und Terminalhaar ein und derselben Person zu untersuchen.

Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, genehmigt (Antrag „Hormonelle Proliferation und Apoptose im humanen Haarfollikel“ vom 28.11.2001 mit Erweiterungsantrag „Endokrine Wirkmechanismen im menschlichen Haarfollikel“ vom 27.11.2003).

Die Weitergabe der Proben erfolgte gemäß Ethikantrag anonym.

Die Altersspanne der Probanden lag zwischen 45 bis 69 Jahren. Da die Untersuchung der Vellus- und Terminalhaare ein und desselben Probanden nur an Proben aus Gesichtsstraffungen möglich war, erfolgten diese ersten Untersuchungen ausschließlich an Kopfhautproben weiblicher Probanden.

Es wurden insgesamt 26 Proben von 15 Spendern untersucht, die Anzahl der jeweiligen Schnitte variierte von 1 bis 4 (siehe Tab. 14). Für die einwandfreie Beurteilung der Haarfollikel von den oberflächlichen bis zu den tiefen Kompartimenten erfolgte die Begutachtung insbesondere der Terminalhaarfollikel über mehrere Serienschnitte hinweg.

2.1 Immunhistochemie

2.1.1 Prinzip

Der Nachweis und die Lokalisation von Zielstrukturen (Antigene) in Gewebeschnitten erfolgt über immunhistochemische Verfahren. Dabei wird zunächst ein Primärantikörper (PAK) an das zu untersuchende Antigen gebunden und anschließend über Sekundärantikörper und eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht.

Die Färbungen von β -Defensin (hBD-1, hBD-2 und hBD-3) wurden aufgrund der hohen Sensitivität mit der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) (Hsu und Raine, 1981) durchgeführt. Bei dieser Methode macht man sich zunutze, dass das Glykoprotein Avidin (A) vier Moleküle des Vitamins Biotin (B) bindet.

Nach der Kopplung des spezifischen PAK an das zu untersuchende Antigen bindet ein kovalent biotinylierter Sekundärantikörper (SAK) mit seiner Fab-Region an die Fc-Region des PAK.

Danach wird dem Ansatz ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex zugefügt. Über freie Stellen am Avidin bindet der Komplex am biotinylierten sekundären Antikörper (siehe Abb. 9). Das konjugierte Enzym Peroxidase (P) katalysiert normalerweise die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff.

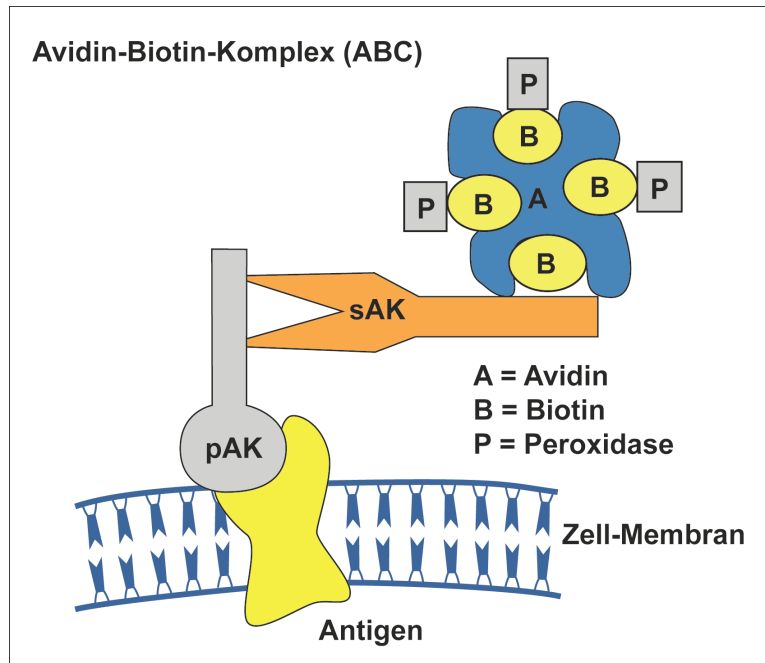


Abb. 9: Die Antikörper-ABC-Bindungskaskade. Der primäre Antikörper (PAK) bindet spezifisch am Antigen, der biotinylierte sekundäre Antikörper (SAK) erkennt wiederum spezifisch das Fc-Fragment des PAK. Der konjugierte Avidin-Biotin-Komplex bindet im letzten Schritt über das Biotin am sekundären Antikörper. (modifizierte Abbildung und Beschreibung von Theiß C 2000).

Da das Gewebe ebenfalls Peroxidase enthält und die antikörpergebundene Peroxidase sowie die endogene Peroxidase die gleiche Chromogenreaktion katalysieren, ist es zur Minimierung der unspezifischen Hintergrundfärbung erforderlich, die Aktivität der endogenen Peroxidase mit Methanol und Wasserstoffperoxid zu inhibieren. Zum gleichen Zweck werden die Ansätze vor der Zugabe des PAK mit Normalserum (NS) inkubiert. Bestandteile des Normalserums maskieren stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente, die über eine antigenunabhängige Bindung der PAK ein Hintergrundsignal hervorrufen könnten. Um eine Bindung des SAK an Komponenten der Proteinlösung zu vermeiden, sollte das NS aus der gleichen Spezies wie der SAK stammen (Bourne, 1983).

2.1.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Im Forschungszentrum (Clinical Research Center for Hair and Skin Science) der Hautklinik Charité – Universitätsmedizin, Campus Mitte, wurden an einem Kryostaten (Kryostat Microm. Leika, Jung Frigocut 2800 N) unter Verwendung eines C-Schliff-Messers und bei einer Verarbeitungstemperatur von etwa $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aus den Proben $5\text{ }\mu\text{m}$ starke Gewebeschnitte angefertigt. Für die Expressionsunter-

suchungen der β -Defensine wurde Haut verwendet. Die Orientierung der tiefgefrorenen Hautproben auf dem Objekthalter wurde so gewählt, dass der Haarfollikel in Längsrichtung geschnitten werden konnte. Da ungefärbte, frisch geschnittene Präparate verwendet wurden, mussten die Proben zum Teil mehrmals entfernt und neu befestigt werden, bis eine geeignete Position erreicht wurde.

Dadurch konnten aus jeder Probe genügend Gewebeschnitte mit longitudinal angeschnittenen Follikeln gewonnen werden. Nach Lufttrocknung der Schnitte für 20 Min. bei Raumtemperatur erfolgte die Lagerung bis zur Durchführung der Färbungen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.3 Durchführung der Avidin-Biotin-Methode

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Pap-Pen-Fettstift umrandet. Zunächst wurden die Kryoschnitte für 10 Min. in Azeton fixiert.

Zur Blockierung der unspezifischen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte 15 Min. in 1,5 % Wasserstoffperoxid mit 2,5 % Methanol in Aqua bidestillata inkubiert. Anschließend wurde nach den Herstellerangaben des ABC Elite RTU Kit verfahren. Nach 30 Min. Inkubation der Schnitte mit normalem Pferde-Serum aus dem Kit zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Der Antikörper gegen humanes β -Defensin wurde für 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlicher Waschung in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (3×5 Min.) wurde der biotinylierte sekundäre Antikörper für 30 Min. aufgetragen. Wieder erfolgte eine gründliche Waschung (3×5 Min.) in PBS und anschließend die Inkubation mit dem ABC-Reagenz (Vectastain ABC Kit, Vector) für 30 Minuten, wiederum gewaschen waren die Objektträger anschließend bereit für die Färbung mit einem Chromogen. Die Kryoschnitte wurden mit dem NovaRed Substrate Kit unter mikroskopischer Kontrolle für mindestens 3–5 Min. gefärbt. Nach einer gründlichen Waschung in PBS (3×5 Min.) wurde die Gegenfärbung mit Meyers blauem Hämalaun für 10 Min. durchgeführt. Dieser Farbstoff wurde im Folgenden durch die Elektronen im Leitungswasser über 10 Min. aktiviert. Die fertig gefärbten Schnitte wurden nun getrocknet (für NovaRed abgedunkelt über Nacht) und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

Die Epidermis eines jeden Abschnitts übt eine positive Kontrollfunktion aus, da die Immunlokalisierung bereits in der Epidermis abgebildet ist (Wu et al., 2008; Meyer-Hoffert et al., 2007; Gläser et al., 2005; Harder and Schröder, 2002).

Tab. 2: Färbeprotokoll für Immunhistochemie

Fixierung der Hautschnitte in Azeton	10 Min.
Blockierung unspezifischer Peroxidasereaktion 1,5 % H ₂ O ₂ + 2,5 % Methanol in Aqua bidest	15 Min.
Inkubation mit Normalserum (aus dem Kit) 200 µl PBS + 3 µl Serum (Ziege)	30 Min.
Inkubation mit Avidin	15 Min.
Spülen in PBS	5–10 Min.
Inkubation mit Biotin	15 Min.
Spülen in PBS	5–10 Min.
Inkubation mit Primärantikörper (PAK) ° Ziege-Anti-Human-hBD-1 (1:100) ° Ziege-Anti-Human-hBD-2 (1:100) ° Kaninchen-Anti-Human-hBD-3 (1:150) Verdünt mit Serum A-B	über Nacht bei 4 °C
3 x Spülen in PBS	10 Min.
Inkubation mit Sekundärantikörper (SAK) 200 µl PBS + 3 µl NS + 1 µl anti-Ziege/Anti-Kaninchen	30 Min.
3 x Spülen in PBS	10 Min.
Inkubation mit ABC-Reagenz 100 µl PBS + 2 µl Reagenz A + 2 µl Reagenz B	30 Min.
3 x Spülen in PBS	10 Min.
Färbung Inkubation mit AEC-Cromogenreagenz-Lösung, mikroskopische Kontrolle	> 5 Min.
Inkubation in dest. Wasser 2 x	10 Min.
Gegenfärbung in Meyers blauem Hämalaun	10 Min.
Inkubation in Leitungswasser	10 Min.
Trocknen lassen Fading-Effekt	über Nacht
Eindecken in Glyceringelatine	

2.1.4 Evaluation der Immunfärbung

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgt semiquantitativ an einem Zeiss-Mikroskop. Die genaue Zuordnung zu den Regionen und Schichten der einzelnen Follikel ermöglicht eine Kartierung der Antikörperbindung. Hierzu werden die einzelnen Strukturen in ihre morphologischen Bereiche eingeteilt.

Für den VHF, IHF sowie den THF werden folgende Regionen unterschieden: Infundibulum, Isthmus, Wulst, suprabulbärer Bereich und Bulbus. Für diese einzelnen Regionen werden wiederum die einzelnen Schichten mit ihren Zellpopulationen unterschieden. In der suprabulbären und bulbären Region der AWS wird wieder in einen inneren, mittleren und äußeren Bereich unterschieden. Die seborrhischen Drüsen werden in Ductusepithel, äußere undifferenzierte Sebozyten und mittige differenzierte Sebozyten unterteilt. Die ekkrinen Drüsen werden ebenfalls bewertet. Die Epidermis wird in basal, mittig und oberflächlich aufgeteilt. Die Gegenkontrolle der Ergebnisse erfolgt stichprobenartig durch einen zweiten Beobachter.

a) Negativkontrollen

Zur Kontrolle der Spezifität der β -Defensin-Immunfärbung wurde für jeden Antikörper eine Negativkontrolle angefertigt. Die Negativkontrollen wurden mit einem irrelevanten Antikörper behandelt. Dazu wird der Schnitt nach dem obigen Protokoll (Tab. 2) behandelt, man verzichtet jedoch auf den PAK.

Alle durchgeführten Negativkontrollen wiesen keine Anfärbung im Haarfollikel, sondern nur eine leichte, nicht zellgebundene Hintergrundfärbung in der Epidermis auf.

b) Auswertung

Die einzelnen Zelltypen wurden nach morphologischen Kriterien semiquantitativ ausgewertet und zugeordnet. Nach der tabellarischen Zusammenstellung der anatomischen Strukturen erfolgte eine Bewertung der Färbeintensität gemäß folgender Abstufungsgrade:

- negativ (-)
- schwach positiv (+)
- positiv (++)
- stark positiv (+++)

2.1.5 Verwendete Materialien

a) Verwendete Primärantikörper (PAK)

Humanes β -Defensin-1 (hBD-1)

Wir benutzten den polyklonalen Ziege-anti-human- β -Defensin-1-Antikörper (N-20) von Santa Cruz Biotechnology. Verdünnung: 1:100 in PBS.

Produkt: Jede Phiolen enthält 200 μ g IgG in 1,0 ml PBS, das 0,1 % Natriumazid und 0,2 % Gelatine enthält.

Lagerung bei 4 °C, nicht einfrieren; stabil für ein Jahr nach Versand.

Humanes β -Defensin-2 (hBD-2)

β -Defensin-2 (C-17) ist ein Affinität-polyklonaler Ziege-Antikörper, der gegen ein Peptid angehoben wird, das am Amino-Terminus von β -Defensin-2 menschlichen Ursprungs gebildet wird. Es wurde von Santa Cruz Biotechnology hergestellt.

Verdünnung: 1:100 in PBS.

Produkt: Jede Phiolen enthält 200 μ g IgG in 1,0 ml PBS, das 0,1 % Natriumazid und 0,2 % Gelatine enthält.

Lagerung bei 4 °C, nicht einfrieren; stabil für ein Jahr nach Versand.

Humanes β -Defensin-3 (hBD-3)

Wir verwendeten den polyklonalen Kaninchen-anti-human- β -Defensin-3-Antikörper (DEFB103) von Orbigen, San Diego, USA.

Verdünnung: 1:150 in PBS.

Produkt: Jede Phiolen enthält 100 μ g gereinigten polyklonalen Kaninchen-Antikörper in PBS mit 0,09 % Natriumazid (W/V).

Lagerung: Gekühlt zwischen 2–8 °C bis zu 6 Monaten haltbar.

Tab. 3: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Ziege-anti-human- β -Defensin-1 (N-20)	Santa Cruz	SC-10849	1 : 100
Ziege-anti-human- β -Defensin-2 (C-17)	Santa Cruz	SC-10854	1 : 100
Kaninchen-anti-human- β -Defensin-3 (DEFB103)	Orbigen	PAB-10216	1 : 150

b) Verwendete Normalseren (NS) und Sekundärantikörper (SAK)

Die Kombinationen PAK, SAK und NS bei der Immunhistochemie müssen aufeinander abgestimmt sein.

Alle Seren und Sekundärantikörper sind von der Firma Dako, Hamburg.

Tab. 4: Verwendete Normalseren und Sekundärantikörper

PAK	SAK (biotinyliert)	NS
Ziege-anti-human- β -Defensin-1	Anti-Ziege IgG	Kaninchen
Ziege-anti-human- β -Defensin-2	Anti-Ziege IgG	Kaninchen
Kaninchen-anti-human- β -Defensin-3	Anti-Kaninchen IgG	Pferd

c) Chemikalien und Reagenzien

Allgemeine Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Vector Laboratories, Dako Cytomation, J. T. Baker (Deventer, NL) usw. bezogen. Die Bezugsquelle richtete sich nach dem jeweils aktuellen Preisangebot.

Die Chemikalien entsprechen bei jeder Analyse mindestens dem Reinheitsgrad.

Tab. 5: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Azeton	J. T. Baker, Deventer, NL	8002
2,5 % Methanol	J. T. Baker, Deventer, NL	8045
1,5 % Wasserstoffperoxid	Merck	1.085.071.000
Dako Pen	Glostrup, Denmark	S2002
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Deutschland	L 182-50
AB-Serum	Biotest	805135
Meyers blaues Hämalaun	Dr. K. Hollborn & Söhne	0101E
ABC Elite RTU Kits	Vector Laboratories	Pk-7200
Avidin/Biotin-Blocking Kits	Vector Laboratories	SP-2001
AEC + High Sensitivity Substrate Chromogen ready to use	Dako Cytomation	K3461
Peroxidase Nova Red TM Substrate Kits	Vector Laboratories	SK-4800
Dako ® Protein Block Serum-free, ready to use	Dako Cytomation	X0909

Tab. 6: Geräte und Zubehör

Geräte/Zubehör	Hersteller	Modell
Mikroskop	Zeiss	Zeiss-Axioskop
Inverses Mikroskop	Olympus	1X50
Kryostat	Leica	Jung Frigocut 2800 N
Rührer	IKA ® Labortechnik	RH basic
Schüttler	IKA ® Labortechnik	Schüttler MTS 4
Mixer	Janke & Kunkel IKA ® Labortechnik	VF2
Pipetten, Pipettenzubehör	Eppendorf	-
Zentrifuge	Heraeus	Multifuge 3 S-R
Objektträger	Menzel-Gläser, Deutschland	Super Frost Plus
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Deutschland	Super Frost Plus

2.2 Immunfluoreszenz

2.2.1 Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen

2.2.1.1 Prinzip

In der Fluoreszenz-Immunhistochemie (Abb. 10) werden mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte (F) sekundäre Antikörper (SAK) eingesetzt. Die Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffs absorbieren dieses Licht und emittieren Licht einer anderen, längeren Wellenlänge. Bei der Betrachtung der Ansätze durch einen für die emittierte Wellenlänge selektiv durchlässigen Filter leuchten die angefärbten Zellen vor einem dunklen Hintergrund.

Der an das Antigen bindende primäre Antikörper (PAK) wurde mit Hilfe eines spezifisch gegen diesen gerichteten SAK nachgewiesen.

Für unsere Färbungen wurden SAK benutzt, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-iso-thio-cyanat) konjugiert waren. Da die Bindung des SAK an einem jeweils spezifischen PAK erfolgt, ist unter dem Fluoreszenzmikroskop die Lokalisation dieser Bindung indirekt sichtbar. Der SAK ist an ein Chromogen gekoppelt, das eine charakteristische Fluoreszenz zeigt.

FITC hat sein Absorptionsmaximum bei 490 nm und erzeugt eine grüne Fluoreszenz. Die charakteristischen Eigenschaften für FITC sowie die zur Anregung zugehörigen Filter sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

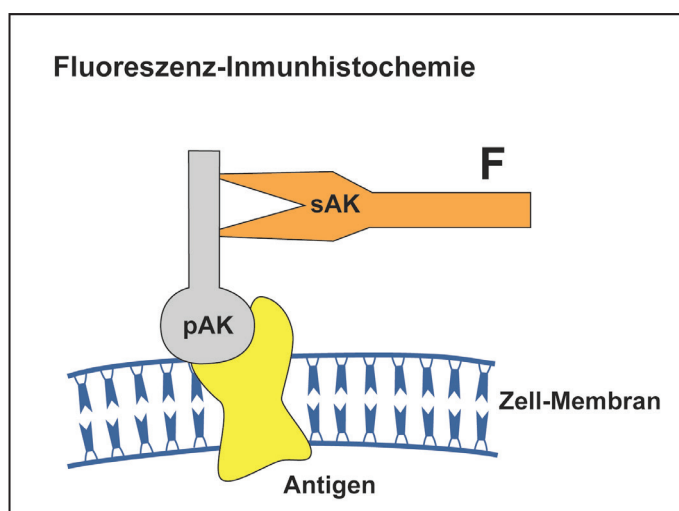


Abb. 10: Fluoreszenz-Immunhistochemie. Der spezifisch gegen ein zu untersuchendes Antigen gerichtete primäre Antikörper (PAK) wird mit Hilfe eines mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten (F) sekundären Antikörpers (SAK) detektiert. (modifizierte Abbildung und Beschreibung von Theiß C 2000).

Folgende technische Ausrüstung wurde dabei benutzt (Tabelle 7).

Tab. 7: Fluoreszenzfarbstoffe, Filtermodul, Anregungsfilter und Emission

Fluoreszenzfarbstoffe	Filtermodul	Anregungsfilter	Emission
FITC	U-NIBA/ WBV	490 nm	517 nm
DAPI	-	358 nm	463 nm

Der Fluoreszenzfarbstoff **DAPI** (4',6-Diamidino-2-phenylindol) wird in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid, DNA) verwendet.

Die DAPI-Färbung erzeugt eine blaue Fluoreszenz der Zellkerne, wodurch die Zellen detektierbar und unterscheidbar waren. Bei manchen Anwendungen empfiehlt es sich zur Schonung der anderen Fluoreszenzfarbstoffe, DAPI als letzten Farbstoff anzuregen. Da DAPI bei Lichtkontakt schnell ausbleicht, erfolgt der Einsatz von Anti-Fading-Mitteln. Diese verzögern das Ausbleichen (fading), so dass sich das Zeitfenster für den Nachweis am Mikroskop verlängert.

NIBA (Grünfluoreszenzfilter), alternativ: **WBV** 330–385 > 420 nm

2.2.2 Anfertigung von Kryostatschnitten

Die in ein Tissue-Freezing-Medium eingebetteten Hautstücke wurden (Jung Frigocut 2800 N, Leica, Deutschland) bei -25 °C in einem Kryostaten geschnitten. Die Schnitte mit einer Dicke von 5 µm (Messer: C-Schliff, Reichert-Jung, Heidelberg) wurden anschließend auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen.

2.2.3 Durchführung der Immunfluoreszenz

Nach Fixierung der Schnitte in Azeton für 10 Minuten und Waschen in PBS wurde die Waschlösung auf dem Objektträger kräftig abgeschlagen. Danach wurden die Gewebeschnitte mit einem Pap-Pen-Fettstift umrandet, um unspezifische Kreuzreaktionen zu vermeiden (1 Stunde mit Dako-Proteinblock zu blockieren). Danach erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (PAK: bei hBD-1, -2 Ziege anti-human, bei hBD-3 Kaninchen anti-human). Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die mit Sekundärantikörpern (SAK: FITC-Anti-Ziege und FITC-Anti-Kaninchen) konjugierten Fragmente von Ziege-anti-human-IgG und Kaninchen-anti-human-IgG hinzugegeben und zum letzten Mal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 15 Min. mit der DAPI-Lösung inkubiert. Der Farbstoff interkaliert in die DNA, so dass die Zellkerne sichtbar werden. Die Anregung mit blauem Licht bewirkt eine intensive grüne Emission. Die erzeugten Immunfluoreszenzmuster können so besser mit den anatomischen Strukturen der Haut verglichen werden.

Tab. 8: Färbeprotokoll für Immunfluoreszenz

Azeton-Fixierung	Raumtemperatur	10 Min.
Waschen mit PBS	Raumtemperatur	10 Min.
Waschlösung auf dem Objektträger kräftig abschlagen	Raumtemperatur	1–2 Min.
mit Pap-Pen-Fettstift durchgängige Paraffin-Kreise ziehen, darf nicht lecken, Abstand zum Gewebe halten	Raumtemperatur	1–2 Min.
Blockieren mit Dako-Proteinblock	Raumtemperatur	60 Min.
Primärer Antikörper (PAK) verdünnt in humanem AB-Serum	Raumtemperatur	60 Min.
Waschen mit PBS	Raumtemperatur	10 Min.
Sekundärer Antikörper (SAK) verdünnt in humanem AB-Serum	Raumtemperatur	45 Min.
Waschen mit PBS	Raumtemperatur	10 Min.
in Vector DAPI montiert	Raumtemperatur	15 Min.

2.2.4 Materialien, Reagenzien, Geräte

a) Verwendete Primärantikörper

Humanes β -Defensin-1 (hBD-1)

Ziege-anti-human- β -Defensin-1 (N-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ist ein polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen das humane β -Defensin-1.

Die Verdünnung betrug hier 1:10 in PBS.

Humanes β -Defensin-2 (hBD-2)

Ziege-anti-human- β -Defensin-2 (C-17) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ist ebenfalls ein polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen das humane β -Defensin-2.

Die Verdünnung betrug ebenfalls 1:50 in PBS.

Humanes β -Defensin-3 (hBD-3)

Kaninchen-anti-human- β -Defensin-3 (DEFB103) (Orbigen, USA) ist ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen das humane β -Defensin-3. Es wurde 1:50 in PBS verdünnt.

Tab. 9: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Ziege-anti-human-hBD-1 (N-20)	Santa Cruz Biotechnology	<i>Sc-10849</i>	1 : 10
Ziege-anti-human-hBD-2 (C-17)	Santa Cruz Biotechnology	<i>Sc-10854</i>	1 : 50
Kaninchen-anti-human-hBD-3 (DEFB103)	Orbigen	<i>PAB-10216</i>	1 : 50

b) Verwendete AB-Seren und Sekundärantikörper

Wie bereits bei der lichtmikroskopischen Immunhistochemie erläutert, müssen auch bei der Immunfluoreszenz Primärantikörper, Sekundärantikörper und des AB-Serum (humanes Serum) aufeinander abgestimmt sein.

Die nachfolgende Tabelle 10 listet die verwendeten Kombinationen von PAK, SAK und AB-Serum bei den Immunfluoreszenz-Analysen auf:

Tab. 10: Verwendete AB-Seren und Sekundärantikörper

PAK	SAK	AB-Serum
Ziege-anti-human-hBD-1	FITC-anti-Ziege-IgG	Human
Ziege-anti-human-hBD-2	FITC-anti-Ziege-IgG	Human
Kaninchen-anti-human-hBD-3	FITC-anti-Kaninchen-IgG	Human

Tab. 11: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
FITC-anti-Ziege	Vector Labs	A 11- 041
FITC-anti-Ziege	Vector Labs	A 11- 041
FITC-anti-Kaninchen	Vector Labs	Fi-1000

Die Sekundärantikörper stammen von Vector Laboratories, USA.

Tab. 12: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Azeton	J. T. Baker, Deventer, NL	8002
PBS Dulbecco	Biochrom A6	L 182-50
Einbettmedium für Gefrierhistologie	Leica Instruments GmbH, Nussloch	Jung Frigocut
Flüssiger Stickstoff	-	-
Dako-Pen	Dako, Glostrup, Denmark	S2002
Protein Block Serum-Free	Dako, Hamburg	X909
AB-Serum	Biotest, Deutschland	-
DAPI	Vector Laboratories, USA	-

Tab. 13: Benutzte Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Fluoreszenzmikroskop*	Olympus	BX60F3
inverses Mikroskop	Olympus	1X50
Kryostat-Mikrotom	Leica Instruments GmbH, Nussloch	Jung Frigocut 2800 N
Messer	C-Schliff, Reichert	Jung, Heidelberg
Rührer	IKA ®Labortechnik	RH basic
Schüttler	IKA ® Labortechnik	MTS4
Mixer	Janke & Kunkel IKA ®Labortechnik	VF2
Zentrifuge	Heraeus	Multifuge 3 S-R
Pipetten, Pipettenzubehör	Eppendorf	-
Rechner und Software	Computer der Fa. IBM	Typ/Softwareprogramm

* mit einem Ölimmersionsobjektiv

c) Fluoreszenzmikroskopie, Fotos

Die Ergebnisse wurden fotografisch über eine an das Mikroskop angeschlossene Kameraeinrichtung dokumentiert. Die Schwarz-Weiß-Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera gemacht, für Farbdiaspositive wurde eine Lichtempfindlichkeit von 64 ASA gewählt.

d) Fluoreszenzmikroskop

In einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Modell BX60F3, Hamburg) wurde das gefärbte Objekt über das Ölimmersionsobjektiv mit Anregungslicht einer für den verwendeten Farbstoff geeigneten Wellenlänge bestrahlt. Dabei wurden das Vorkommen und die Verteilung der verschiedenen β -Defensine polyklonaler Antikörper am Kryostatschnitt betrachtet.

2.2.5 Auswertung

Die Auswertung der β -Defensin-Signale (β -Defensin-Immunreaktivität) erfolgte semiquantitativ. Zellen mit einem grünen Fluoreszenzsignal im Zellkern wurden als β -Defensin-positiv bewertet. Die DAPI-Gegenfärbung erzeugte über die Interkalation in die DNA ein blaues Fluoreszenzsignal im Zellkern. Tabelle 7 zeigt die geeigneten Filterkombinationen, die zur einfachen Auswertung verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ nach dem Grad der erreichten Färbeintensität.

Dabei umfasste die Einleitung:

- keine Reaktion (-)
- schwache Reaktion (+/-)
- positive Reaktion (+)
- nicht ausgewertet (n. a.)

3 Ergebnisse

3.1 Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in den untersuchten Gewebeproben

Die Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Haut und in den einzelnen Haarfollikeln wurde in Hautproben aus dem behaarten Kopf und der Retroaurikularregion untersucht.

Es wurden insgesamt 148 Kryotatschnitte beurteilt (hBD-1 = 51, hBD-2 = 54, hBD-3 = 43).

Die detaillierten Expressionmuster der jeweiligen Defensine sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Die Besonderheiten der Expressionen in THF und VHF werden im Folgenden dargestellt.

Die Tabellen 15, 16 und 17 zeigen den Durchschnitt von THF, IHF und VHF.

Tab. 14: Übersicht über das untersuchte Material und die jeweils ausgewerteten Haarfollikeltypen

Follikeltyp	Identifikationsnummer	Anzahl der Schnitte
THF	09110460 T	3
THF	10110458 T	2
THF	01120469 T	2
THF	02090445 T	1
THF	26010559 T	3
THF	16020549 T	1
THF	15030564 T	4
THF	090904 T	1
THF	26040527 T	3
THF	29060552 T	2
THF	06070564 T	3
IHF	16020549 I	2
IHF	26080356 I	1
IHF	26040527 I	2
IHF	29060552 I	1
VHF	02090445 V	3
VHF	20100443 V	2
VHF	15030564 V	2
VHF	090904 V	1
VHF	09110460 V	2
VHF	06070564 V	2
VHF	29060552 V	1
VHF	26040527 V	2
VHF	16020549 V	1
VHF	05070547 V	2
VHF	28080347 V	2

Tab. 15: Durchschnittliche Expression der einzelnen β -Defensine in Terminalhaarfollikeln

Antikörper			β -Defensin-1			β -Defensin-2			β -Defensin-3		
Haartyp			Terminal			Terminal			Terminal		
Epidermis		Strat. Corneum	++/+++			++/+++			+++		
		Strat. Granulos	+/++			+/++			-/+/++		
		Mittig	+/++			+/++			-/+/++		
		Basal	0/+			+			+		
Infundibulum											
		Strat. Granulos	+/++			++			++		
		Mittig	+/++			++			++		
		Basal	0/+			++			++		
Isthmus											
	IWS	Huxley	++/+++			0			0		
		Henle	++/+++			0			++		
	ÄWS	Innen	0			+			0/+		
		Mittig	0			+			0/+		
		Basal	+			+/++			+/++		
Seborrh. Drüse											
		Innen	0			0/+			+/++		
		Basal	+			+/++			+++		
		Ductus	0/+			++/+++			+++		
Schweißdrüse											
			0/+/++			++			+++		
Infraseboglandulärer Bereich											
Wulst											
		Kortex	0			0			0		
	IWS	Haarkutikula	0			0			0		
		Huxley	++/+++			0			0		
		Henle	++/+++			0			0/++		
	ÄWS	Innen	0/+			+			+/++		
		Mittig	0/+			+			+/++		
		Basal	+/++			++			++/+++		
		fibröse Hülle	0			0			0		
Suprabulbärer Bereich											
		*	1/3O	1/3M	1/3U	1/3O	1/3M	1/3U	1/3O	1/3M	1/3U
		Kortex	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Haarkutikula	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IWS	Kutikula	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Huxley	++/+++	++/ +++	0	0	+++	+++	0	0/+/++	+/++
		Henle	++/ +++	++/ +++	++	0	0	0	0	0	0
	ÄWS	Innen	+	0/+	0	+/++	+	0/+	++/+++*	+/+/+++*	+/+++*
		Mittig	+	0/+	0	+/++	+	0/+	++	++/+++	0/+
		Basal	+	0/+	0	+/++	+	0/+	++/+++°	++/+++°	+/+/+++°
		fibröse Hülle	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haarbulbus											
		dermale Papille	0			0/+ /++			0/+ /++		
		Basalmembr.	0			0			0		
		Matrixzellen	0			0			0		
	IWS		0			+++			+++		
	ÄWS		0			0			0		
		fibröse Hülle	0			0			0		

* 1/3O = oberes Drittel, 1/3M = mittleres Drittel und 1/3U= unteres Drittel

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach positiv, ++ = positiv, +++ = stark positiv,

+++° = Positivität in 4 von 11 Fällen, +++* = Grenzzone

Tab. 16: Durchschnittliche Expression der einzelnen β -Defensine in Intermediärhaarfollikeln

Antikörper			β -Defensin-1			β -Defensin-2			β -Defensin-3		
Haartyp			Intermediär			Intermediär			Intermediär		
Epidermis		Strat. corneum	++/+++			++/+++			+++		
		Strat. granulos	+/++			+/++			+/++		
		Mittig	+/++			+/++			+/++		
		Basal	0/+			+			+		
Infundibulum											
		Strat. granulos	++			++			++		
		Mittig	+/++			++			+/++		
		Basal	0/+			++			+/++		
Isthmus											
	IWS	Huxley	++/+++			0			0		
		Henle	++/+++			0			++		
	ÄWS	Innen	0			+			++		
		Mittig	0			+			++		
		Basal	+			+			++		
Seborrh. Drüse											
		Innen	0			+/++			+/++		
		Basal	+			++			+++		
		Ductus	0/+			++			+++		
Schweißdrüse											
			0/+/++			++			+++		
Infraseboglandulärer Bereich											
Wulst											
	IWS	Kortex	0			0			0		
		Haarkutikula	0			0			0		
		Huxley	++/+++			0			0		
		Henle	++/+++			0			++		
	ÄWS	Innen	0/+			+			++		
		Mittig	0/+			+			++		
		Basal	+/+			++			+++		
		fibröse Hülle	0			0			0		
Suprabulbärer Bereich											
		*	1/3O	1/3M	1/3U	1/3O	1/3M	1/3U	1/3O	1/3M	1/3U
		Kortex	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Haarkutikula	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IWS	Kutikula	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Huxley	++	0	0	++/+++	++/+++	++/+++	0	+++	+/++
		Henle	++	++	++	0	0	0	0	0	0
	ÄWS	Innen	0	0	0	0/+	0	0/+	+/+/+++*	+/+/+++*	+
		Mittig	0	0	0	0/+	0	0/+	+/+/+++	+/+/+++	+
		Basal	0	0	0	0/+	0	0/+	+/+/+++	+/+/+++	+/++
		fibröse Hülle	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haarbulbus											
		dermale Papille	0			0			0		
		Basalmembr.	0			0			0		
		Matrixzellen	0			0			0		
	IWS		0			+++			+++		
	ÄWS		0			0			0		
		fibröse Hülle	0			0			0		

* 1/3O = oberes Drittel, 1/3M = mittleres Drittel und 1/3U = unteres Drittel

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach positiv, ++ = positiv, +++ = stark positiv, +++* = Grenzzone

Tab. 17: Durchschnittliche Expression der einzelnen β -Defensine in Vellushaarfollikeln

Antikörper			β -Defensin-1			β -Defensin-2			β -Defensin-3		
Haartyp			Vellus			Vellus			Vellus		
Epidermis		Strat. corneum	++/+++			++/+++			+++		
		Strat. granulos	+/++			+/++			+/++		
		Mittig	+/++			+/++			+/++		
		Basal	0/+			+			+		
Infundibulum											
		Strat. granulos	++			++			++		
		Mittig	+/++			+/++			+/++		
		Basal	0/+			+/++			+/++		
Isthmus											
	IWS	Huxley	++			0			0		
		Henle	++			0			0/+ ^o		
	ÄWS	Innen	0			+			++		
		Mittig	0			+			++		
		Basal	0			+			++		
Seborrh. Drüse											
		Innen	0			+/++			+/++		
		Basal	+			++			+++		
		Ductus	0/+			+++			+++		
Schweißdrüse											
			0/+			++			+++		
Infraseboglandulärer Bereich											
Wulst											
		Kortex	0			0			0		
	IWS	Haarkutikula	0			0			0		
		Huxley	++			0			0		
		Henle	++			0			0		
	ÄWS	Innen	0/+			+			++/++*		
		Mittig	0/+			+			++		
		Basal	0/+			+			++/+++ ^o		
		fibröse Hülle	0			0			0		
Suprabulbärer Bereich											
		*	1/3O	1/3M	1/3U	1/3O	1/3M	1/3U	1/3O	1/3M	1/3U
		Kortex	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Haarkutikula	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IWS	Kutikula	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Huxley	++	0	0	++/+++	++/+++	++/+++	0	++	++
		Henle	++	++	++	0	0	0	0	0	0
	ÄWS	Innen	0	0	0	0/+	0/+	0	+/+/+*	+/+/+*	+/++
		Mittig	0	0	0	0/+	0/+	0	++	+/++	+/++
		Basal	0	0	0	0/+	0/+	0	++/+++	++/+++	+/+++
		fibröse Hülle	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haarbulbus											
		dermale Papille	0			0/+			0/+		
		Basalmembr.	0			0			0		
		Matrixzellen	0			0			0		
	IWS		0			+++			+++		
	ÄWS		0			0			0		
		fibröse Hülle	0			0			0		

* 1/3O = oberes Drittel, 1/3M = mittleres Drittel und 1/3U = unteres Drittel

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach positiv, ++ = positiv, +++ = stark positiv, ++^o = in 3 von 5 Fällen, ++* = Grenzzone, +++^o = in 2 von 15 Fällen

3.1.1 Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in gesunder Haut (Tab. 18)

Die untersuchten β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 fanden sich im gesamten Stratum corneum, wobei die Expression von hBD-1 und hBD-2 etwas schwächer als die Expression von hBD-3 war.

Die β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurden in unterschiedlicher Intensität in der gesamten Epidermis exprimiert.

Die Expression aller β -Defensine war basal eher schwach, während sie in den suprabasalen Zellschichten sehr deutlich war.

hBD-3 ergab eine ungleichmäßige Färbung einzelner Schnitte.

Insgesamt zeigten die Proben gesunder Epidermis des Gesichtsbereiches und des Kapillitium hinsichtlich ihres Expressionsmusters keinen Unterschied.

Tab. 18: Expression von β -Defensin in gesunder Epidermis (n = 11)

Polyklonal. Antikörper (Ak)	Str. corneum	Epidermis	
		suprabasal	basal
hBD- 1	++/+++	+ /+++	0/+
hBD-2	++/+++	+ /+++	+
hBD-3	+++	- /+ /+++	+

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach positiv, ++ = positiv, +++ = stark positiv

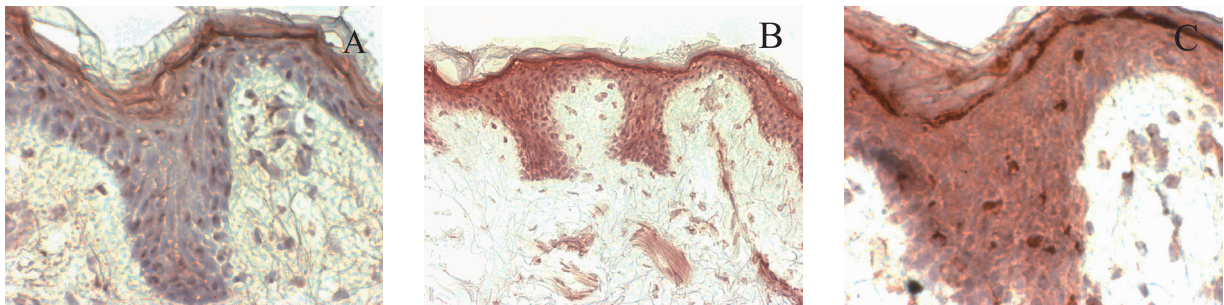


Abb. 11: Anfärbung der Epidermis

A) Epidermis hBD-1 (x40)

B) Epidermis hBD-2 (x20)

C) Epidermis hBD-3 (x40)

3.1.2 Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Haarfollikelapparat

Zur Charakterisierung der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurden die Terminalhaarfollikel in mehrere morphologische und gleichzeitig unterschiedlich differenzierte Bereiche unterteilt. Nur vollständig ausgebildete Haarfollikel des Anagens wurden in der Untersuchung berücksichtigt.

Folgende Haarfollikelanteile sollen im Einzelnen betrachtet und ausgewertet werden:

- Der Bulbusbereich: Die äußere Wurzelscheide (mit einer äußeren und inneren Zellschicht) lässt sich im Terminalhaarfollikel differenzieren, schnittbedingt ist es nicht immer möglich und wurde daher in dieser Untersuchung nicht bewertet. Die innere Wurzelscheide, die germinativen Zellen, die Matrixzellen und die Melanozytengrenzen sich voneinander ab. Die drei erstgenannten Zelltypen sollen in dieser Untersuchung schwerpunktmäßig berücksichtigt werden.
- Die suprabulbäre Region: In diesem Follikelbereich können die verschiedenen Schichten der äußeren und inneren Wurzelscheide, der Haarkutikula und des Kortex eindeutig identifiziert werden. Es wurden alle Schichten dieses Bereiches mit einbezogen. Zur Beschreibung des regionalen Expressionsmusters sollen alle Schichten dieses Bereiches herangezogen werden. Für ein besseres Verständnis wurde die suprabulbäre Region in oberes Drittel, mittleres Drittel und unteres Drittel eingeteilt.
- Die Wulstregion: In diesem Follikelbereich lassen sich die innere Wurzelscheide und die äußere Wurzelscheide untersuchen.
- Die Isthmusregion: Unterschieden werden im Isthmusbereich in dieser Untersuchung basale und innere Zellschichten der äußeren Wurzelscheide und die innere Wurzelscheide. Da die Differenzierung der äußeren Wurzelscheide im Isthmusbereich derjenigen der suprasedoglandulären Region weitgehend entspricht, sollen beide zusammenfassend dargestellt werden.
- Das Infundibulum: Es befindet sich im distalen Bereich der Haarfollikel und hat eine äußere Wurzelscheide sowie eine Hornschicht. In diesem Follikelbereich können die inneren und basalen Schichten eindeutig identifiziert werden. Es ist der Bereich zwischen Wurzelhaarfollikel und Follikelwand.

3.1.3 Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaarfollikelapparat

3.1.3.1 Im Terminalhaarfollikel

Die β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 zeigten folgende Expressionsmuster in den verschiedenen Anteilen des Terminalhaarfollikels (n = 11).

a) Haarbulbus (Tabelle 19)

hBD-2 und hBD-3 lassen eine starke Expression im Bereich der inneren Wurzelscheide des Bulbus erkennen (Abb. 12).

Die dermale Papille im Haarbulbusbereich zeigte in 3 von 11 Fällen eine schwache oder deutliche Expression von hBD-3, ebenso in 5 von 11 Proben mit hBD-2.

In allen Fällen von hBD-1 gab es keine Expression. Die germinativen Zellen wiesen keine Expression auf.

Tab. 19: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaarfollikelbereich des Haarbulbus (n = 11)

Polyklonal. Ak	äußere Zellschichten	innere Zellschichten	germinative Zellen	dermale Papille
hBD-1	0	0	0	0
hBD-2	0	+++	0	0/+ / +++
hBD-3	0	+++	0	0/+ / +++

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach positiv, ++ = positiv, +++ = stark positiv

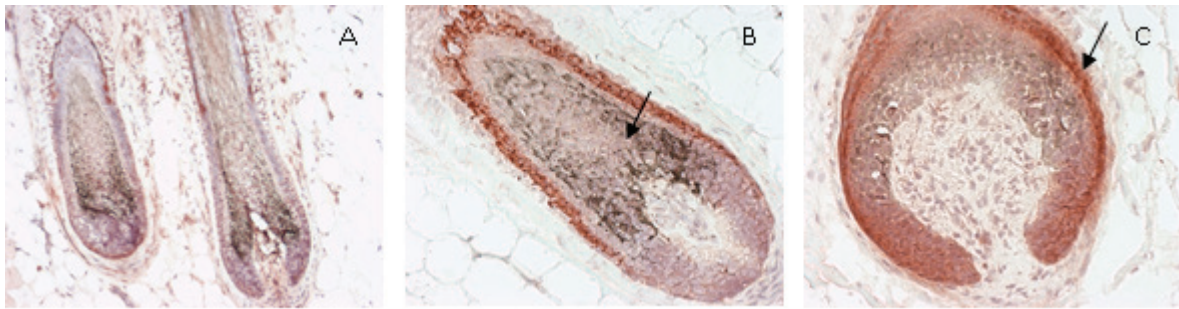


Abb. 12: Anfärbung der inneren Wurzelscheide im Bulbus
 A) Terminalhaarfollikel hBD-1 (x10)
 B) Terminalhaarfollikel hBD-2 (x20)
 C) Terminalhaarfollikel hBD-3 (x20)
 In B und C zeigen die Pfeile Positivität in der IWS.

b) Suprabulbäre Region (Tabelle 20)

Im Suprabulbärbereich fand sich eine gleichmäßige starke Anfärbung der inneren Wurzelscheide für hBD-1 (siehe Abb. 13A, B und C).

Im Bereich aller Zellschichten der äußeren Wurzelscheide, d. h. sowohl in den äußeren Zellschichten (ÄWS-ÄZ) als auch in den inneren Zellschichten (ÄWS-IZ), konnte eine Expression beim Einsatz der hBD-1, hBD-2 und hBD-3 beobachtet werden, aber mit unterschiedlicher Intensität (mit Betonung in der basalen Zellschicht von hBD-3 in 4 von 11 Proben): für hBD-1 schwach, hBD-2 positiv und hBD-3 positiv bis stark. Für hBD-2 wurde die Expression im oberen und mittleren Drittel beobachtet, für hBD-1 hingegen nur im oberen Drittel. Ab dem unteren bis in das obere Drittel des Suprabulbärbereiches stieg die Positivität der hBD-3 in der ÄWS, aber in einigen Schnitten war die Intensität im gesamten suprabulbären Bereich gleichmäßig und stark.

Sowohl im mittleren und unteren Drittel der suprabulbären Region wurden Huxley-Schichten der inneren Wurzelscheide sehr stark und gleichmäßig für hBD-2 (siehe Abb. 13 E und F) als auch schwach bis positiv für hBD-3 (siehe Abb. 13 I) exprimiert.

Im unteren Drittel der suprabulbären Region konnten nur mit hBD-1 die Henle-Schichten der inneren Wurzelscheide angefärbt werden (siehe Abb. 13 C).

Die Medulla konnte mit anti-hBD-2 in 4 von 11 Proben dargestellt werden (siehe Abb. 28 C und D).

Keine der eingesetzten polyklonalen Antikörper zeigten eine Expression der korrespondierenden β -Defensine in Kutikula, Haarkutikula und Haarkortex.

Eine selektive Anfärbung der Grenzzone zwischen äußerer und innerer Wurzelscheide (es ist keine eindeutige Zuordnung zu Zellen der äußeren oder der inneren Wurzelscheide möglich) konnte mittels hBD-3 sowohl im oberen, im mittleren als auch im unteren Drittel der suprabulbären Region beobachtet werden (siehe Abb. 13 H und I).

Tab. 20: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaarfollikel in der suprabulbären Region (n = 11)

Suprabulbäre Region		hBD-1	hBD-2	hBD-3	
Oberes Drittel	ÄWS	innere	+	+ / +++	++ / +++*
		basale	+	+ / +++	++ / +++ ^o
	IWS	Huxley	++ / +++	0	0
		Henle	++ / +++	0	0
Mittleres Drittel	ÄWS	innere	0 / +	+	+ / +++ / +++*
		basale	0 / +	+	++ / +++
	IWS	Huxley	++ / +++	+++	0 / + / ++
		Henle	++ / +++	0	0
Unteres Drittel	ÄWS	innere	0	0 / +	+ / +++*
		basale	0	0 / +	+ / +++
	IWS	Huxley	0	+++	+ / +++
		Henle	++	0	0
Kutikula		0	0	0	
Haarkutikula		0	0	0	
Haarkortex		0	0	0	

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv, ++* = Positivität der Grenzzone, +++^o = Positivität der basalen Schicht in 4 von 11 Proben

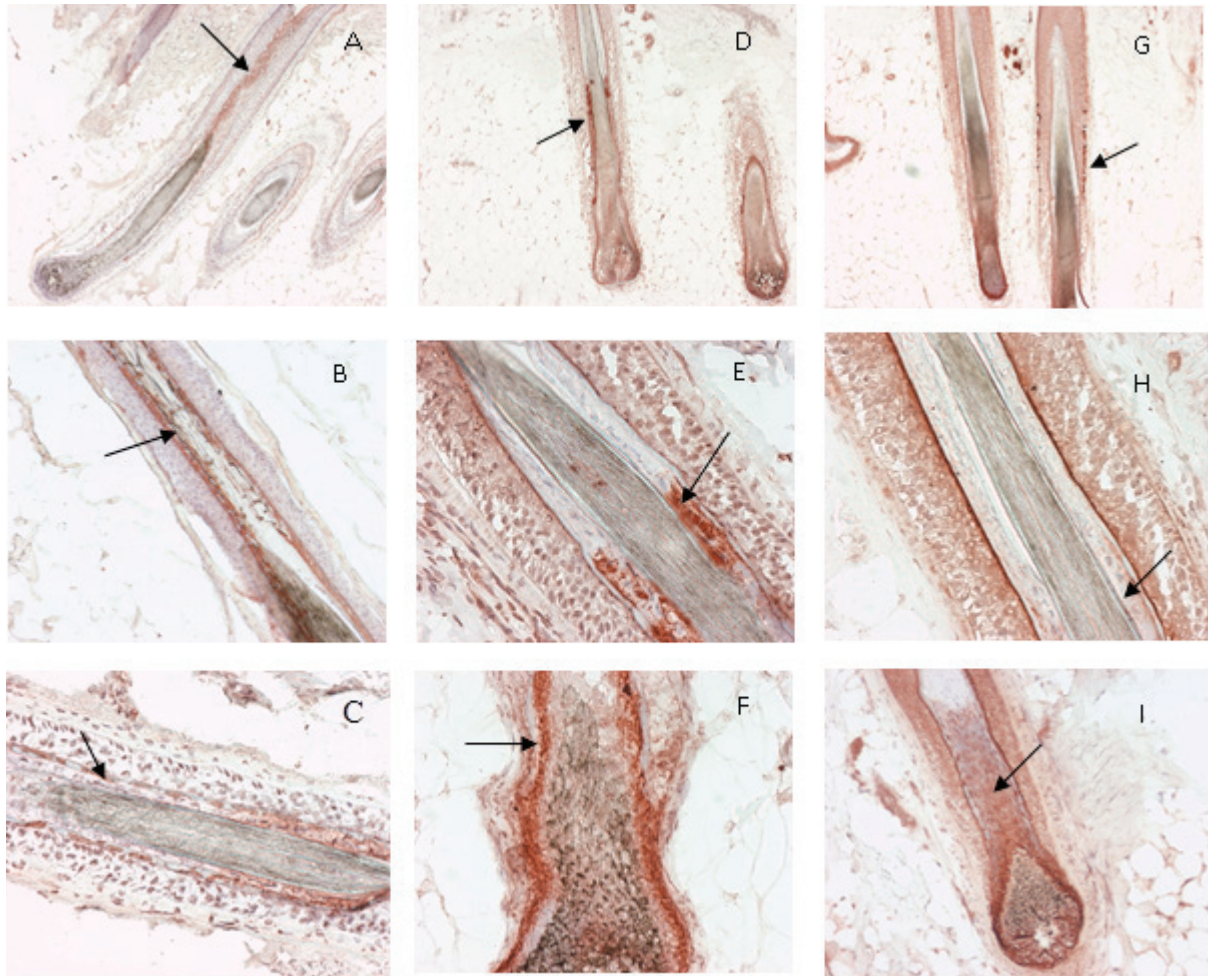


Abb. 13: Anfärbung der inneren Wurzelscheide mit den polyklonalen Ak hBD- 1, hBD-2 und hBD-3

- A) Im Terminalhaarfollikel (THF) hBD-1 Ansicht (x4)
- B) Im suprabulbären Bereich (mittleres Drittel) des THF: hBD-1 (x10)
- C) Im suprabulbären Bereich (zwischen unterem und mittlerem Drittel) bis zum unteren Drittel ist nur die Henle-Schicht positiv, ab dem mittleren Drittel beide IWS: hBD-1 (x20)
- D) Im THF: hBD-2 Ansicht (x4)
- E) Im suprabulbären Bereich (oberes und mittleres Drittel) des THF: hBD-2 (x20)
- F) Im suprabulbären Bereich (unteres Drittel): hBD-2 (x20)
- G) Im THF: hBD-3 Ansicht (x4)
- H) Im suprabulbären Bereich (mittleres und unteres Drittel) des THF: hBD-3 (x20)
- I) Im suprabulbären Bereich (mittleres und unteres Drittel) des THF: hBD-3 (x10)

Die Pfeile zeigen in A und B die IWS stark positiv, in C die Henle-Schicht positiv, in D, E und F die Huxley-Schicht, in G die basalen Zellen, in H die Grenzzone und in I die Huxley-Schicht jeweils positiv.

c) Der Wulst (Tabelle 21)

Im Bereich der äußeren Wurzelscheide zeigten die β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 unterschiedliche Expressionen:

hBD-3 exprimierte positiv bis stark in den Basalzellen und schwach bis positiv in den Innenzellen, hBD-2 schwach in den Innenzellen und positiv in den Basalzellen und hBD-1 negativ oder schwach in den Innenzellen und schwach bis positiv in den basalen Zellen (siehe Abb. 14A, B, und C).

hBD-1 ist im Bereich der inneren Wurzelscheide positiv bis stark positiv exprimiert, sowohl in der Henle-Schicht als auch in der Huxley-Schicht, hBD-3 wurde in 6 von 11 Proben nur in der Henle-Schicht nachgewiesen.

Tab. 21: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaarfollikel im Wulst (n = 11)

Polyklonal. Ak	ÄWS		Henle	IWS Huxley	Kutikula	Haarkortex
	innere	basale				
hBD-1	0/+	+ /+++	++ /+++	++ /+++	0	0
hBD-2	+	++	0	0	0	0
hBD-3	+ /+++	++ /+++	0 /++	0	0	0

0 = negativ, +/- = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

d) Der Isthmus und Supraseboglandulärbereich (Tabelle 22)

Eine Expression im Bereich der gesamten äußeren Wurzelscheide konnte bei den β -Defensinen hBD-1, hBD-2 und hBD-3 beobachtet werden, zum Beispiel in allen angefärbten Betonungen der basalen Zellen, aber mit unterschiedlicher Intensität, wobei sich hBD-1 negativ in den inneren Zellen und schwach in den basalen Zellen darstellte, sowie hBD-2 schwach in den inneren Zellen und mit leichter Betonung in den basalen Zellen positiv. Außerdem steigerte sich die Intensität des hBD-3 von den mittleren Zellen bis zur deutlichen Betonung in den basalen Zellen (siehe Abb. 14A, B und C).

hBD-1 zeigte eine positive bis starke Expression in beiden Zellschichten der inneren Wurzelscheide, während hBD-3 nur in der Henle-Schicht der inneren Wurzelscheide festgestellt wurde.

Tab. 22: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Terminalhaarfollikeln im Isthmus und im Supraseboglandulärbereich (n = 11)

Polyklonal. Ak	ÄWS		IWS	
	innere	basale	Henle	Huxley
hBD-1	0	+	++/+++	++/+++
hBD-2	+	+/>+++	0	0
hBD-3	0/+	+/>+++	++	0

0 = negativ, +/- = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

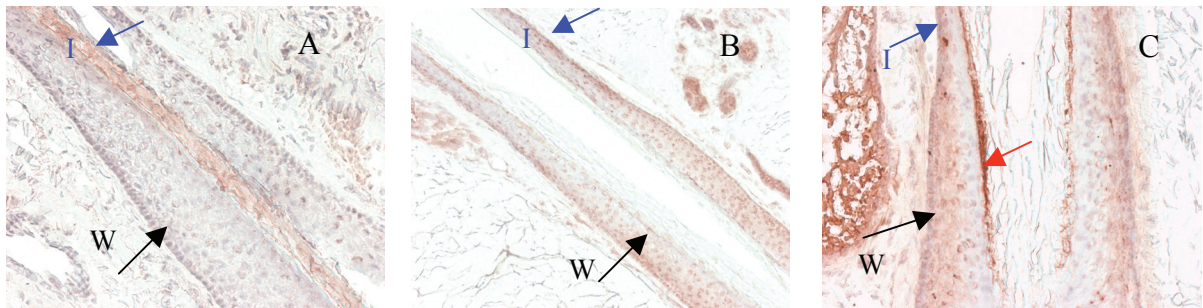


Abb. 14: Anfärbung des Isthmus (I) und des Wulstes (W) mit den polyklonalen Ak hBD-1, hBD-2 und hBD-3
 A) Im Terminalhaarfollikel hBD-1 (x20)
 B) Im Terminalhaarfollikel hBD-2 (x20)
 C) Im Terminalhaarfollikel hBD-3 (x20)

Die Pfeile zeigen im Isthmus mit blauer Farbe und im Wulst mit schwarzer Farbe: in A (I) Positivität von IWS und (W) einige geringe Betonung der basalen Zellen, in B und C sowohl in (W) als auch in (I) eine positive Betonung der basalen und mittleren Zellen.

Der rote Pfeil zeigt in C eine starke Positivität in der Henle-Schicht.

e) Das Infundibulum (Tabelle 23)

Die β -Defensine hBD-2 und hBD-3 zeigten eine positive Expression in den inneren Zellen sowie in den basalen Zellen, hBD-1 weist eine Positivität in den inneren Zellen auf und exprimiert schwach oder negativ in den basalen Zellen, während die drei β -Defensine stark im Stratum corneum angefärbt wurden (siehe Abb. 15 A, B und C).

Tab. 23: Expression in Terminalhaarfollikeln im Infundibulum (n = 11)

Polyklonal. Ak	innere	basale
hBD-1	+/>+++	0/+
hBD-2	++	++
hBD-3	++	++

0 = negativ, +/- = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

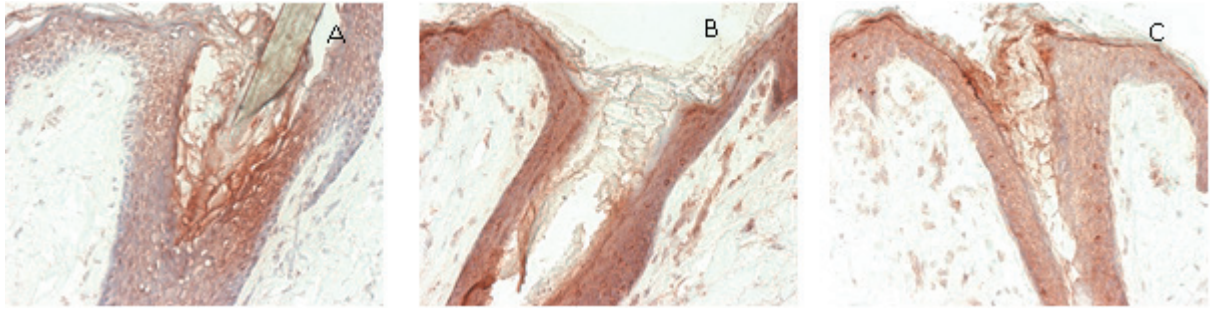


Abb. 15: Anfärbung des Infundibulum mit den polyklonal. Ak hBD-1, hBD-2 und hBD-3
 A) Im Terminalhaarfollikel hBD-1 (x20)
 B) Im Terminalhaarfollikel hBD-2 (x10)
 C) Im Terminalhaarfollikel hBD-3 (x20)

3.1.3.2 In den Talgdrüsen des Terminalhaarfollikelapparates (Tabelle 24)

Die Untersuchungen der Talgdrüsen gesunder Kopfhaut (n = 11) ließen das folgende Expressionsmuster erkennen:

In den inneren differenzierten Zellen konnte kein oder kaum hBD-1 nachgewiesen werden, nur im Ductus und in den basalen undifferenzierten Zellen war hBD-1 schwach oder negativ (siehe Abb. 16 A).

In allen Fällen von hBD-2 waren die basalen undifferenzierten Zellen positiv und die inneren differenzierten Zellen schwach bis positiv, im Ductus positiv bis stark positiv (siehe Abb. 16 B).

In allen Fällen von hBD-3 waren die basalen undifferenzierten Zellen und der Ductus stark sowie die inneren differenzierten Zellen positiv zu erkennen (siehe Abb. 16 C).

Tab. 24: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in den Talgdrüsen des Terminalhaarfollikelapparates (n = 11)

Polyklonal. Ak	basale/undifferenzierte Zellen	innere/differenzierte Zellen	Ductus
hBD-1	+	0/+	0/+
hBD-2	++	0/+	++/+++
hBD-3	+++	+ /+++	+++

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

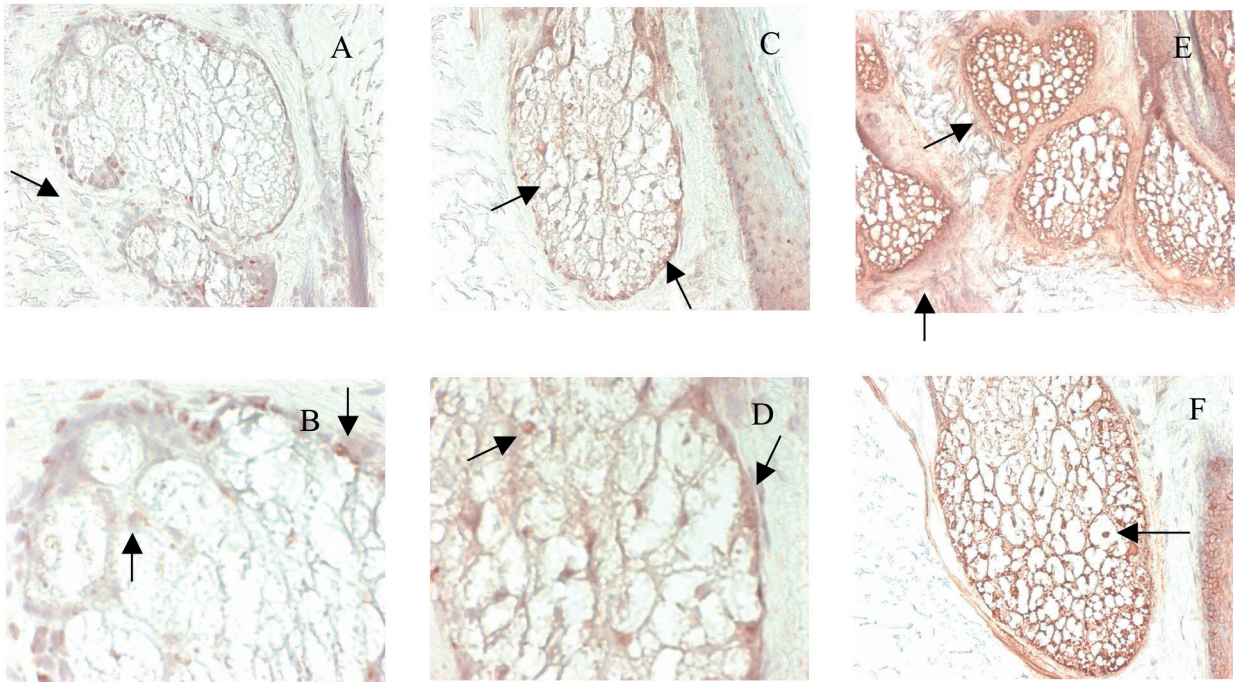


Abb. 16: Anfärbung von Talgdrüsen

- A) Terminalhaarfollikel hBD-1 (x20)
- B) Terminalhaarfollikel hBD-1 (x40)
- C) Terminalhaarfollikel hBD-2 (x10)
- D) Terminalhaarfollikel hBD-2 (x20)
- E) Terminalhaarfollikel hBD-3 (x10)
- F) Terminalhaarfollikel hBD-3 (x20)

Die Pfeile zeigen in A und B eine schwache Positivität der basalen und inneren Zellen, in C sowie D positive Innenzellen und Basalzellen und in E und F innere und basale Zellen stark positiv.

3.1.4 Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaarfollikelapparat

3.1.4.1 Im Vellushaarfollikel

Die verwendeten polyklonalen Antikörper zeigten folgende Expressionsmuster in den verschiedenen Bereichen von Follikeln gesunder Gesichtshaut. Es gab auch ähnliche Anfärbungsmuster für IHF und VHF, deswegen werden die Ergebnisse zusammen gezeigt. In IHF wurden 4 Proben und in VHF 11 Proben untersucht.

a) Haarbulbus (Tabelle 25)

Eine deutliche bis starke Expression im Bereich der IWS zeigten hBD-2 und hBD-3, jedoch war keine Färbung bei hBD-1 zu erkennen (siehe Abb. 17 A, B und C).

Die germinativen Zellen konnten mit keinem der verwendeten polyklonalen Antikörper dargestellt werden.

In der dermalen Papille wurden hBD-2 (9 von 15) und hBD-3 (10 von 15) schwach positiv exprimiert.

In allen Fällen waren die äußeren Zellschichten negativ.

Tab. 25: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaarfollikel im Bereich des Haarbulbus (n = 15)

Polyklonal. Ak	äußere Zellschicht/ÄWS	innere Zellschicht/IWS	germinative Zellen	dermale Papille
hBD-1	0	0	0	0
hBD-2	0	+++	0	0/+
hBD-3	0	++/+++	0	0/+

0 = negativ, +/- = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

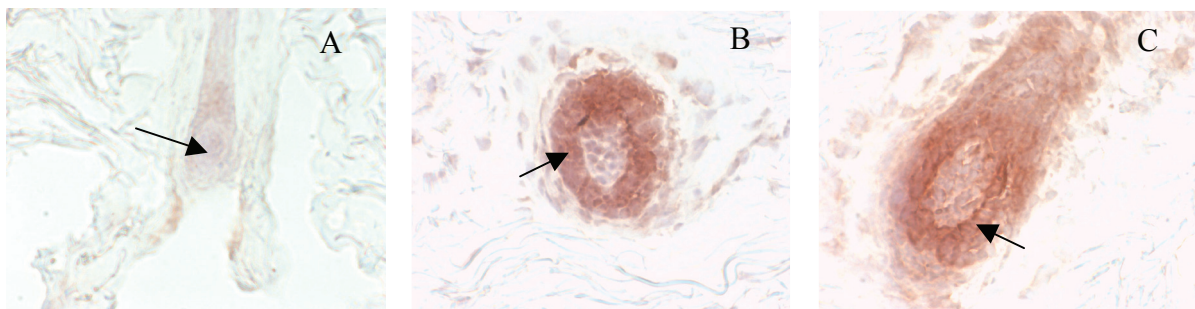


Abb. 17: Anfärbung des Bulbus

- A) Vellushaarfollikel hBD-1 (x20)
- B) Vellushaarfollikel hBD-2 (x40)
- C) Vellushaarfollikel hBD-3 (x40)

Die Pfeile zeigen in A eine negative und in B sowie in C eine positive Expression der β -Defensine in der IWS an.

b) Suprabulbäre Region (Tabelle 26)

Anfärbungen im Bereich der beiden Anteile der äußeren Wurzelscheide im mittleren und unteren Drittel fanden sich bei Verwendung der polyklonalen Antikörper hBD-2 und -3, wobei die Expressionen eine unterschiedliche Intensität zeigten, positiv bis sehr stark bei hBD-3 mit basaler Betonung, deutlich bei hBD-2. Im unteren Drittel der äußeren Wurzelscheide konnte sowohl hBD-1 in beiden Anteilen der IWS als auch hBD-2 nicht dargestellt werden, bei hBD-3 war die Anfärbung nur schwach.

Es wurde keine Anfärbung bei hBD-1 im gesamten Bereich der beiden Anteile der äußeren Wurzelscheide nachgewiesen.

Als Marker der äußeren Wurzelscheide im oberen und mittleren Drittel wurden hBD-2 und hBD-3 mit unterschiedlicher Intensität exprimiert. Die Expression war bei hBD-2 schwach bis positiv, sowohl in der inneren als auch in der basalen Schicht. Bei hBD-3 war die Expression schwach bis positiv in der inneren Schicht und akzentuiert in der basalen Schicht. hBD-1 wurde nicht angefärbt.

Als Marker der inneren Wurzelscheide stellte sich hBD-1 positiv dar, im oberen Drittel war das hBD-1 positiv in beiden Anteilen der IWS, im unteren und mittleren Drittel nur in der Henle-Schicht positiv, während hBD-2 und hBD-3 in der Huxley-Schicht positiv bis stark waren, hBD-2 stellte sich im gesamten suprabulbären Bereich und hBD-3 lediglich im mittleren und unteren Drittel dar.

Als eine Besonderheit bei hBD-3 zeigten sich eine Anfärbung im Grenzgebiet ÄWS und IWS (im mittleren und unteren Drittel) und eine positive Betonung der basalen Schicht.

Tab. 26: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaarfollikel in der suprabulbären Region (n = 15)

		hBD-1	hBD-2	hBD-3
Oberes Drittel ÄWS	innere	0	0/+	+ / + + / + + *
	basale	0	0/+	+ + / + + +
IWS	Huxley	++	+ + / + + +	0
	Henle	++	0	0
Mittleres Drittel ÄWS	innere	0	0/+	+ / + + / + + *
	basale	0	0/+	+ + / + + +
IWS	Huxley	0	+ + / + + +	++
	Henle	++	0	0
Unteres Drittel ÄWS	innere	0	0	+ / + + / + + *
	basale	0	0	+ / + + / + + +
IWS	Huxley	0	+ + / + + +	++
	Henle	++	0	0
Kutikula		0	0	0
Haarkutikula		0	0	0
Haarkortex		0	0	0

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv, ++* = Positivität der Grenzzone

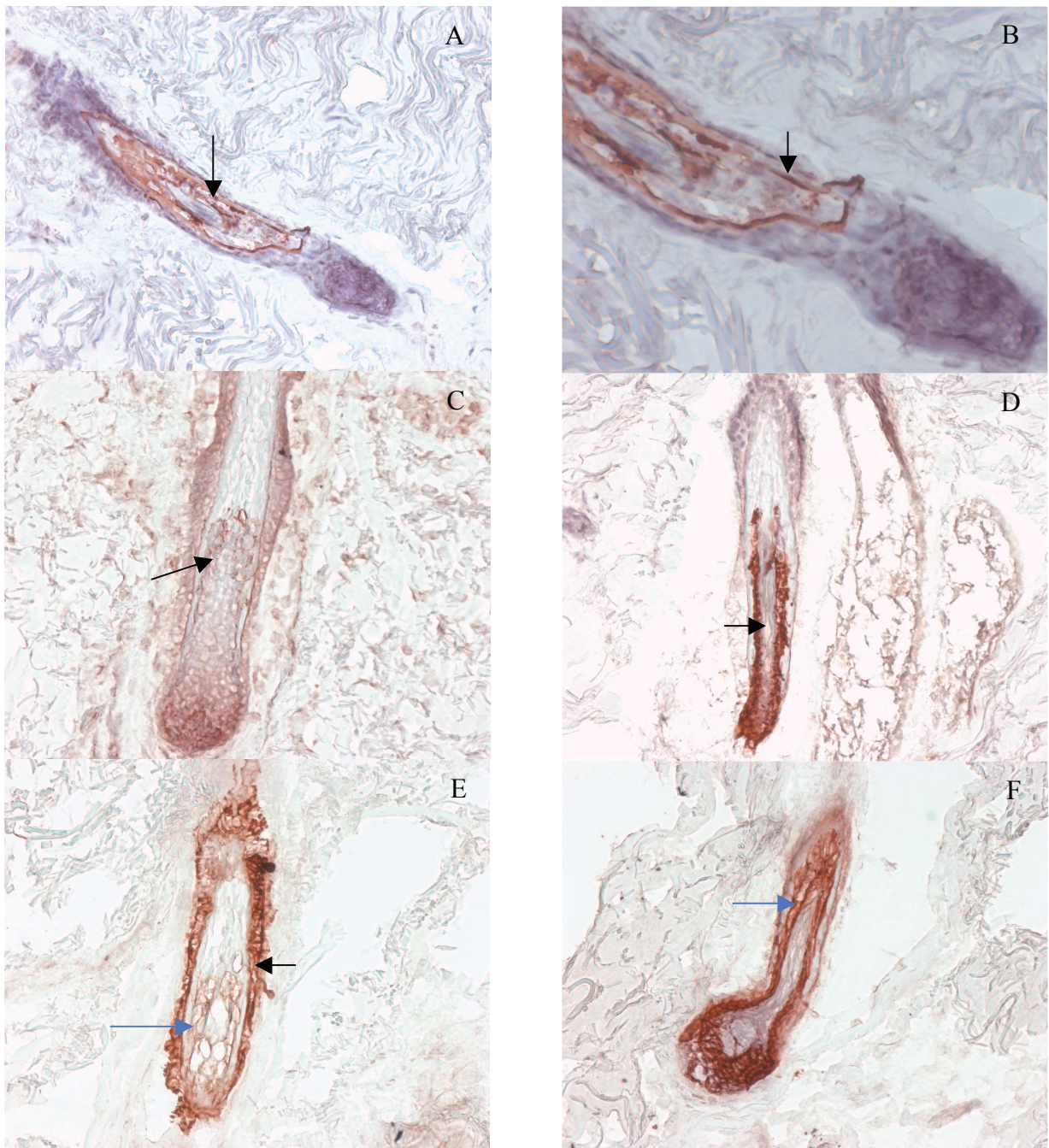


Abb. 18: Anfärbung der Suprabulbärbereiche

- A) Vellushaarfollikel hBD-1 (x20)
- B) Vellushaarfollikel hBD-1 (x40)
- C) Vellushaarfollikel hBD-2 (x20)
- D) Vellushaarfollikel hBD-2 (x20)
- E) Vellushaarfollikel hBD-3 (x20)
- F) Vellushaarfollikel hBD-3 (x20)

Die Pfeile zeigen in A beide Anteile der IWS stark positiv, in B die Henle-Schicht stark positiv, in C eine schwache und in D eine starke Positivität der IWS, in E eine starke Anfärbung der AWS und mit der blauen Farbe in E eine schwache und in F eine positive IWS.

c) Der Wulst (Tabelle 27)

In diesem Bereich fanden sich regelmäßige Anfärbungen der beiden Anteile der äußeren Wurzelscheide bei Verwendung der polyklonalen Antikörper hBD-1, hBD-2 und hBD-3, wobei die Expressionen unterschiedlicher Intensität waren, positiv in den Innenzellen und Basalzellen mit hBD-3 (mit Ausnahme in 2 von 15 Proben, welche basale Betonung hatten), schwach bis deutlich mit hBD-2 in den Innenzellen als auch basal und mit hBD-1 in beiden Schichten negativ oder schwach.

In der inneren Wurzelscheide wurde in beiden Schichten deutlich hBD-1 exprimiert.

Eine selektive Anfärbung der Grenzzone zwischen äußerer und innerer Wurzelscheide konnte mittels hBD-3 in der ganzen suprabulbären Region beobachtet werden (keine eindeutige Zuordnung zu Zellen der äußeren oder der inneren Wurzelscheide möglich (siehe Abb. 19 C).

Für alle verwendeten β -Defensine stellte sich in der Kutikula und im Haarkortex keine Expression dar.

Tab. 27: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaar- und Intermediärhaarfollikel im Wulst (n = 15)

Polyklonal. Ak	ÄWS		IWS			Haarkortex
	innere	basale	Henle	Huxley	Kutikula	
hBD-1	0/+	0/+	++	++	0	0
hBD-2	+	+	0	0	0	0
hBD-3	++/+++*	++/+++ ^o	0	0	0	0

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv, +++^o = basal positiv in 2 von 15 Proben, ++* = Grenzzone

d) Isthmus und Suprasedoglandulärbereich (Tabelle 28)

hBD-1 markiert beide Schichten der IWS (Henle-Schicht sowie Huxley-Schicht) positiv.

hBD-2 und hBD-3 stellten sich in beiden Anteilen der äußeren Wurzelscheide dar, wobei die Expressionen unterschiedlicher Intensität waren, bei hBD-2 positiv, bei hBD-3 ergab sich eine Betonung der äußeren Zellschichten der äußeren Wurzelscheide, die Expression war schwach oder negativ in den Innenzellschichten. hBD-1 wurde in den Basalzellschichten nur schwach exprimiert.

Die innere Wurzelscheide wurde in unterschiedlichem Maße von den verwendeten polyklonalen Antikörpern hBD-1, hBD-2 und hBD-3 markiert. Dabei zeigte sich hBD-1 positiv in der Henle-Schicht und Huxley-Schicht. hBD-3 war nur in 3 von 15 Proben in den Henle-Schichten positiv. hBD-2 konnte nicht nachgewiesen werden.

Tab. 28: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaar- und Intermediärhaarfollikel im Isthmus und Suprasedoglandulärbereich (n = 15)

Polyklonal. Ak	ÄWS		IWS	
	innere	basale	Henle	Huxley
hBD-1	0	0	++	++
hBD-2	+	+	0	0
hBD-3	+	++	0/++ ^o	0

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv, ++^o = in 3 von 15 Proben

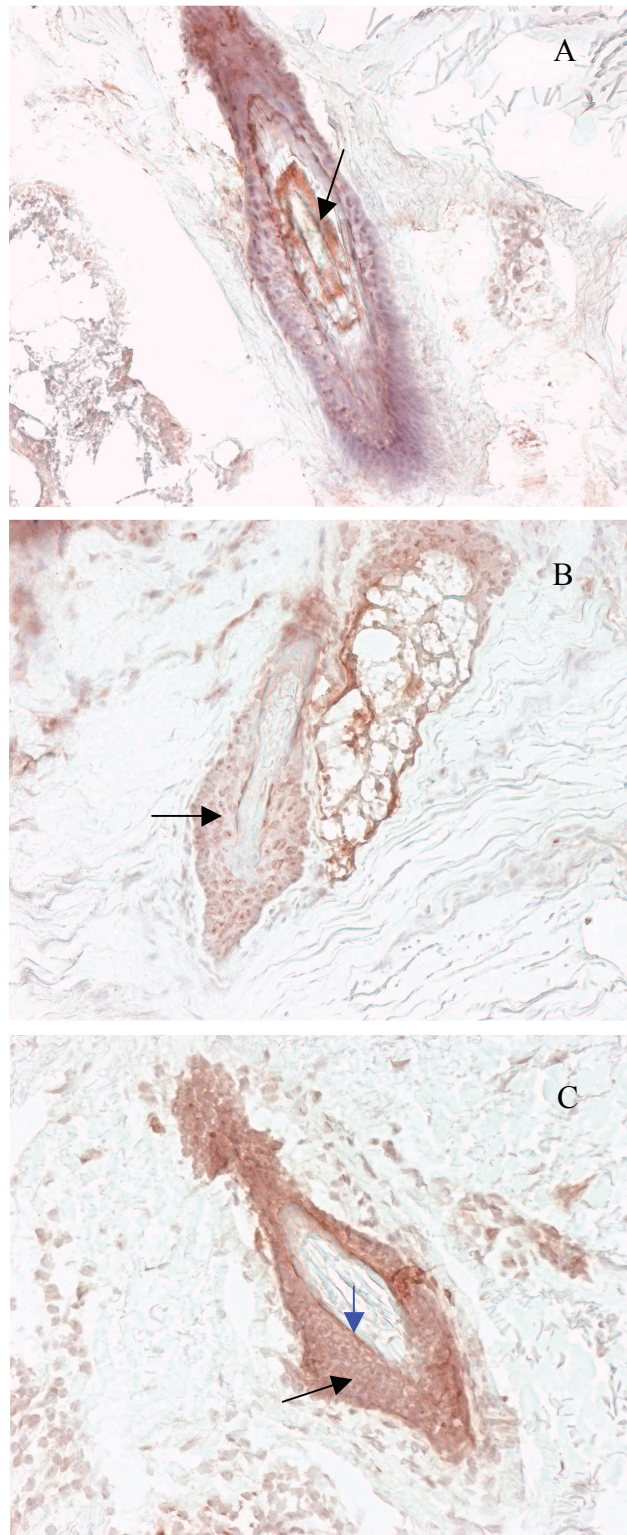


Abb. 19: Anfärbung von Wulst und Isthmus mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3

- A) Vellushaarfollikel hBD-1 (x20)
- B) Vellushaarfollikel hBD-2 (x20)
- C) Vellushaarfollikel hBD-3 (x20)

Die Pfeile zeigen in A eine Positivität der IWS, in B (schwach) und in C (positiv) die regelmäßige ÄWS und mit der blauen Farbe die Grenzzone.

e) Das Infundibulum (Tabelle 29)

Im Bereich der gesamten äußeren Wurzelscheide konnte bei hBD-1, hBD-2 und hBD-3 eine ähnliche Anfärbung in den Innen- und Basalzellen festgestellt werden. Sie stellt sich für hBD-2 und hBD-3 schwach bis positiv dar. Mit hBD-1 zeigte sich eine leichte Betonung in den Innenzellen, die Anfärbung war jedoch nur schwach bis negativ in den Basalzellen.

Die drei β -Defensine wurden im Stratum corneum stark exprimiert (siehe Abb. 20 A, B und C).

Tab. 29: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaar- und Intermediärhaarfollikel im Infundibulum (n = 15)

Polyklonal. Ak	innere	basale
hBD-1	+ / +++	0 / +
hBD-2	+ / +++	+ / +++
hBD-3	+ / +++	+ / +++

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

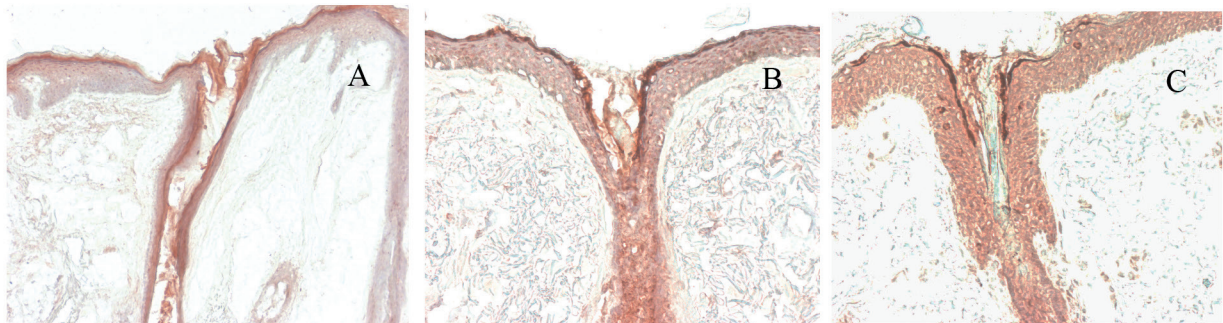


Abb. 20: Anfärbung des Infundibulum mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3

- A) Vellushaarfollikel hBD-1 (x20)
- B) Vellushaarfollikel hBD-2 (x20)
- C) Vellushaarfollikel hBD-3 (x20)

3.1.4.2 In den Talgdrüsen des Vellushaarfollikelapparates (Tabelle 30)

Das Defensinexpressionsmuster der untersuchten Biopsien von Talgdrüsen gesunder Gesichtshaut (n = 11) stellt sich folgendermaßen dar:

Die β -Defensine hBD-2 und hBD-3 färbten die gesamte Talgdrüse, insbesondere den Ductus und die inneren Interzellen, an, wobei die Anfärbung in den basal undifferenzierten Zellen positiv bis stark positiv, in den inneren differenzierten Zellen mit hBD-2 schwach bis positiv und mit hBD-3 positiv bis stark war (siehe Abb. 21 B und C). hBD-1 wurde negativ oder schwach im Ductus in den basalen und inneren Zellen exprimiert.

Tab. 30: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Talgdrüsen des Vellushaarfollikelapparates (n = 11)

Polyklonal. Ak	basale/undifferenzierte Zellen	innere/differenzierte Zellen	Ductus
hBD-1	+	0/+	0/+
hBD-2	++	+/>++	+++
hBD-3	+++	+/>++	+++

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

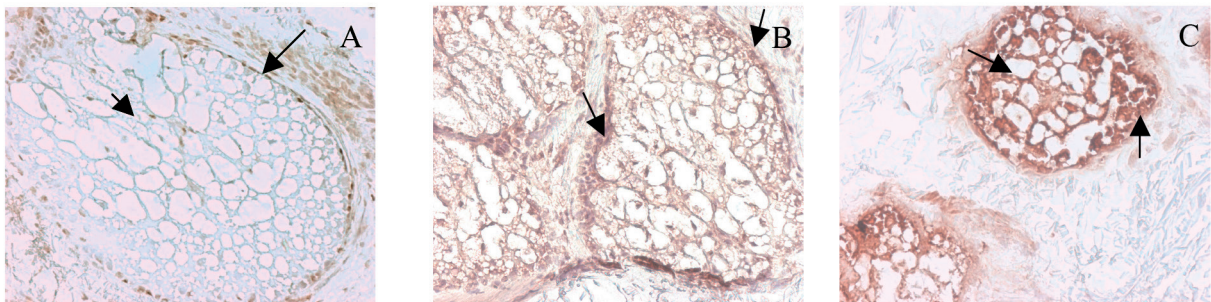


Abb. 21: Anfärbung der Talgdrüse mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3

- A) Vellushaarfollikel hBD-1 (x20)
- B) Vellushaarfollikel hBD-2 (x20)
- C) Vellushaarfollikel hBD-3 (x20)

Die Pfeile zeigen in A die basalen und inneren Zellen schwach, in B den Ductus und die basalen Zellen positiv und in C die basalen und inneren Zellen positiv bis stark.

3.2 Vergleichende Darstellungen und auffälliges Markierungsverhalten

Zunächst soll eine Gegenüberstellung der Ergebnisse des immunhistochemischen Färbeverhaltens der hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in den verschiedenen Anteilen und Schichten von Terminalhaarfollikeln, Intermediärhaarfollikeln und Vellushaarfollikeln erfolgen. Dabei wird die Einteilung in die schon oben eingehend charakterisierten Regionen des Follikelapparates beibehalten. Außerdem werden die Talgdrüsen der drei Haarfollikeltypen verglichen.

Haarbulbus (Tabelle 31)

Die β -Defensine hBD-2 und hBD-3 konnten in allen 3 Haartypen übereinstimmend als Marker der IWS gefunden werden (siehe Abb. 22 D, E, F, G, H und I).

In der äußeren Wurzelscheide im Bulbusbereich ließen sich entsprechend den suprabulbären Verhältnissen sowohl im Vellushaarfollikel als auch im Terminalhaarfollikel und Intermediärhaarfollikel bei den β -Defensinen hBD-1, hBD-2 und hBD-3 keine Expressionen feststellen.

Eine Darstellung der germinativen Zellen gelang bei allen drei Haarfollikeltypen mit keinem der verwendeten Antikörper.

In der dermalen Papille von THF und VHF wurden hBD-2 und hBD-3 negativ oder positiv exprimiert, dagegen wurde für IHF keine Positivität gefunden.

Tab. 31: Gegenüberstellung der Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Terminalhaar-, Intermediärhaar- und Vellushaarfollikeln im Bereich des Haarbulbus

Polyklonal. Ak	äußere Zellschichten ÄWS		Innere Zellschichten IWS		germinative Zellen		dermale Papille	
	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHV/VHF	THF	IHF/VHF
hBD-1	0	0	0	0	0	0	0	0
hBD-2	0	0	+++	+++	0	0	0/+ / ++	0/+
hBD-3	0	0	+++	++ / +++	0	0	0/+ / ++	0/+

0 = negativ, +/- = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

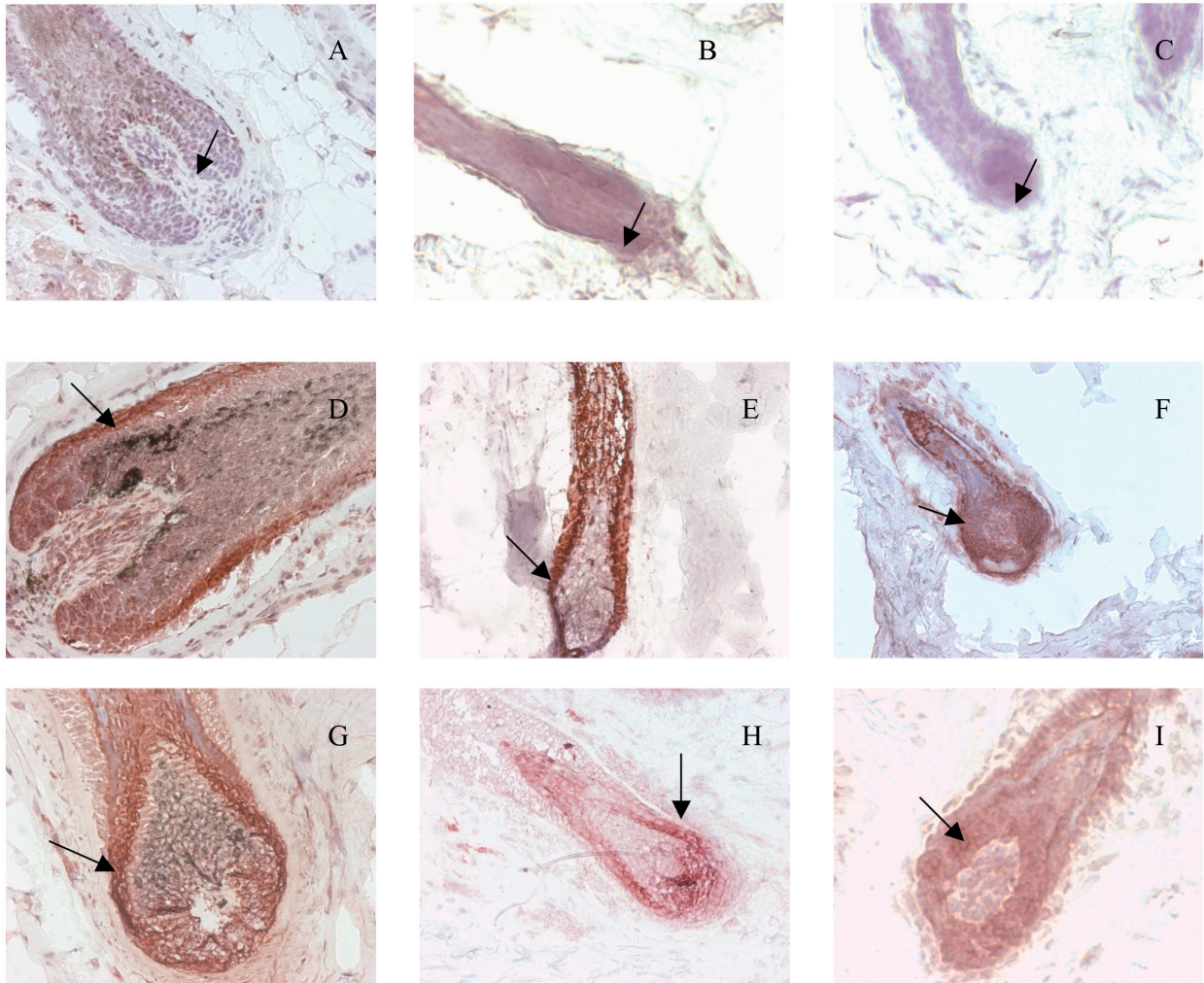


Abb. 22: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Bulbus der drei Haartypen

- A) Terminalhaarfollikel hBD-1 (x20)
- B) Intermediärhaarfollikel hBD-1 (x40)
- C) Vellushaarfollikel hBD-1 (x40)
- D) Terminalhaarfollikel hBD-2 (x20)
- E) Intermediärhaarfollikel hBD-2 (x20)
- F) Vellushaarfollikel hBD-2 (x40)
- G) Terminalhaarfollikel hBD-3 (x20)
- H) Intermediärhaarfollikel hBD-3 (x20)
- I) Vellushaarfollikel hBD-3 (x40)

A, B und C zeigen den Bulbus negativ. Die Pfeile zeigen in D, E, F, G, H und I die innere Wurzelscheide stark positiv.

Suprabulbäre Region (Tabelle 32)

Die Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in THF entspricht derjenigen in VHF und IHF. Die gezeigten Unterschiede im Expressionsverhalten sind gradueller Art.

Im mittleren und unteren Drittel der äußeren Wurzelscheide von THF und VHF wurde mit hBD-1 und hBD-2, sowohl im Terminalhaarfollikel als auch im Vellushaarfollikel und Intermediärhaarfollikel, eine schwache oder keine Anfärbung sichtbar.

Im oberen und mittleren Drittel der äußeren Wurzelscheide färbt das hBD-3 in VHF, IHF und THF die innere Schicht schwach bis positiv an, mit besonderer Akzentuierung in der Basalschicht des Terminalhaarfollikels (in 4 von 11 Proben) und Vellushaarfollikels (in 6 von 15 Proben). Im Gegensatz dazu werden die inneren Zellen der äußeren Wurzelscheide im unteren Drittel der drei Follikeltypen nur schwach oder negativ und die basalen Zellen schwach bis positiv angefärbt (siehe Abb. 23 G, H und I).

hBD-2 wurde als Marker der äußeren Wurzelscheide im oberen Drittel aller drei Haartypen in der Innenschicht und der Basalschicht von THF, IHF und VHF schwach bis deutlich beobachtet. Im mittleren Drittel war es positiv in THF, aber nur schwach oder negativ in VHF.

Im unteren Drittel wurde das hBD-2 schwach bis gar nicht in THF bzw. negativ in VHF nachgewiesen.

Dies betrifft vor allem das hBD-1 im oberen Drittel, dass als Marker der äußeren Wurzelscheide in den Terminalhaarfollikelkeratinozyten schwach ist, in den Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide des VHF jedoch negativ zur Darstellung kommt.

Im mittleren und unteren Drittel der drei Haartypen fanden unterschiedliche Expressionen aller drei Defensine in der inneren Wurzelscheide statt.

Für THF als auch für IHF und VHF wurde das hBD-1 als positiver Marker für das obere und mittlere Drittel in beiden Anteilen der inneren Wurzelscheide gefunden. Im unteren Drittel ergab sich nur eine Darstellung in der Henle-Schicht der 3 Haartypen (siehe Abb. 23 A, B und C).

Eine starke und gleichmäßige Anfärbung in der Huxley-Schicht der inneren Wurzelscheide im oberen Drittel mit hBD-2 fand nur im Vellushaarfollikel statt.

Der THF und der IHF wurden nicht angefärbt, hingegen wurde im mittleren und unteren Drittel in der Huxley-Schicht in THF, IHF und VHF stark exprimiert (siehe Abb. 23 D, E und F).

In der Huxley-Schicht der inneren Wurzelscheide, sowohl im mittleren als auch im unteren Drittel, war hBD-3 schwach bis positiv in VHF sowie positiv in THF und IHF vorhanden (siehe Abb. 23 G, H und I).

Eine Besonderheit von hBD-3 im gesamten suprabulbären Bereich in THF, IHF und VHF war eine positive Expression zwischen der äußeren und inneren Wurzelscheide (Grenzzone).

Tab. 32: Gegenüberstellung der Ergebnisse des immunhistochemischen Färbeverhaltens der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in verschiedenen Anteilen bzw. Schichten der Terminalhaar-, Intermediärhaar- und Vellushaarfollikel in der suprabulbären Region

Suprabulbäre Region		hBD-1		hBD-2		hBD-3	
		THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF
Oberes Drittel	innere	+	0	+ / ++	0 / +	++ / +++*	+ / ++ / +++*
	ÄWS	+	0	+ / ++	0 / +	++ / +++	++ / +++
IWS	Huxley	++ / +++	++	0	++ / +++	0	0
	Henle	++ / +++	++	0	0	0	0
Mittleres Drittel	innere	0 / +	0	+	0 / +	+ / ++ / +++*	+ / ++ / +++*
	ÄWS	0 / +	0	+	0 / +	++ / +++	++ / +++
IWS	Huxley	++ / +++	0	+++	++ / +++	0 / + / ++	++
	Henle	++ / +++	++	0	0	0	0
Unteres Drittel	innere	0	0	0 / +	0	0 / + / +++*	+ / +++*
	ÄWS	0	0	0 / +	0	+ / ++	+ / ++
IWS	Huxley	0	0	+++	++ / +++	+ / ++	++
	Henle	++	++ / +++	0	0	0	0
Kutikula		0	0	0	0	0	0
Haarkutikula		0	0	0	0	0	0
Haarkortex		0	0	0	0	0	0

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv, +++* = Positivität der Grenzzone

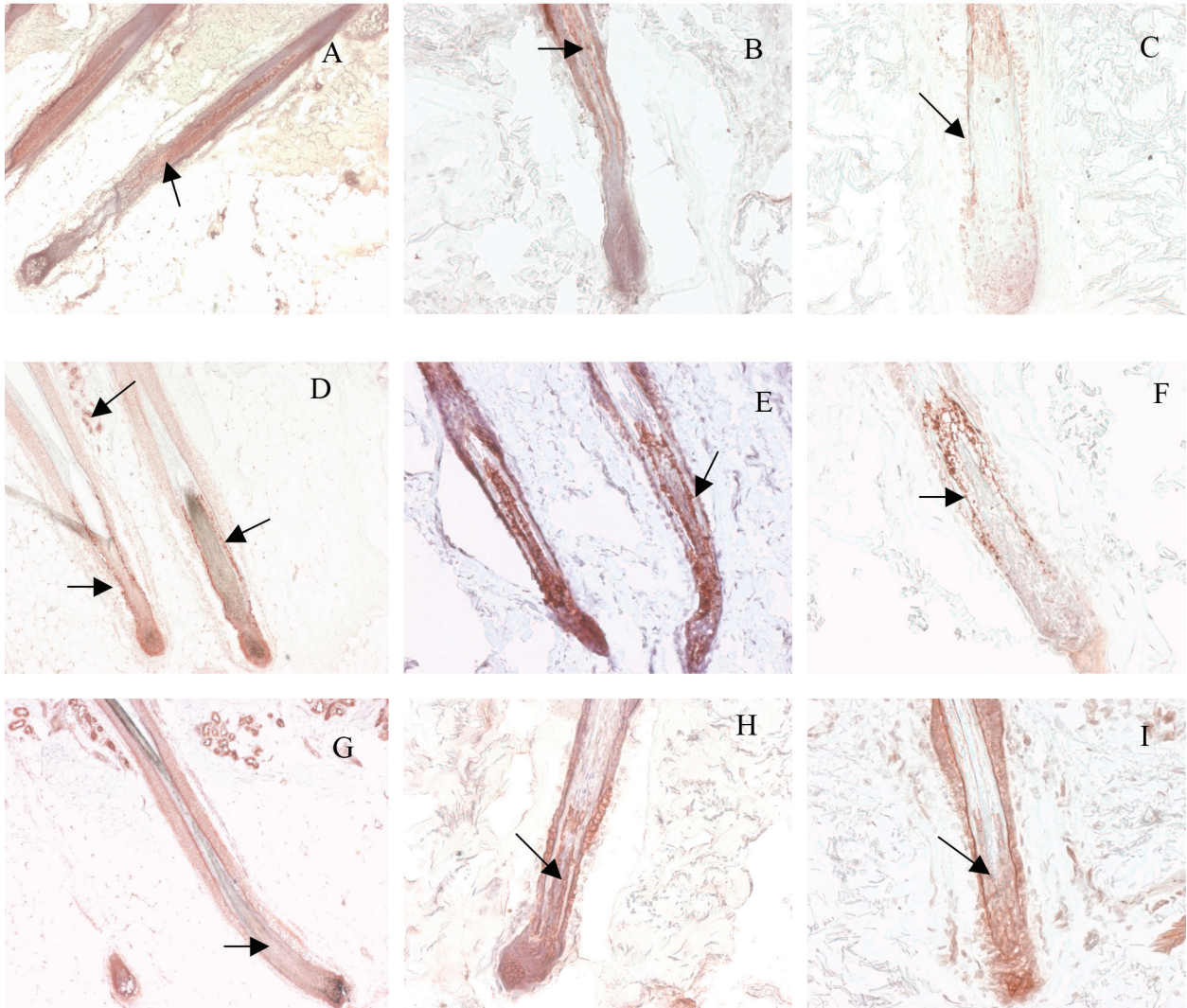


Abb. 23: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im suprabulbären Bereich der drei Haartypen

A) Terminalhaarfollikel	hBD-1 (x2)
B) Intermediärhaarfollikel	hBD-1 (x20)
C) Vellushaarfollikel	hBD-1 (x20)
D) Terminalhaarfollikel	hBD-2 (x2)
E) Intermediärhaarfollikel	hBD-2 (x20)
F) Vellushaarfollikel	hBD-2 (x20)
G) Terminalhaarfollikel	hBD-3 (x2)
H) Intermediärhaarfollikel	hBD-3 (x20)
I) Vellushaarfollikel	hBD-3 (x20)

Die Pfeile zeigen in A und B beide Anteile der IWS positiv, in C die Henle-Schicht positiv, in D, E und F die Huxley-Schicht positiv, in G, H und I die Huxley-Schicht schwach.

Der Wulst (Tabelle 33)

Auch in diesem Bereich entspricht das β -Defensinexpressionsmuster des VHF weitgehend dem des THF, Unterschiede finden sich in der Ausprägung der Expressionsintensität und ihren Verteilungen.

Eine homogene Markierung in beiden Schichten der äußeren Wurzelscheide erfolgte in VHF und IHF bei hBD-1 negativ bis schwach, bei hBD-2 schwach bis positiv und bei hBD-3 positiv. Hingegen stieg die Positivität der hBD-3, hBD-2 und hBD-3 ab den inneren bis zu den basalen Zellen der ÄWS mit unterschiedlicher Intensität. Hierbei war die Expression bei hBD-3 positiv bis stark, bei hBD-2 positiv und bei hBD-1 schwach bis positiv. Die Färbung war entsprechend den epidermalen Verhältnissen basal betont (siehe Abb. 24 D, E und F).

Das hBD-1 wurde stark in der inneren Wurzelscheide des THF und IHF exprimiert, es war in VHF jedoch nur schwach bis deutlich sichtbar (siehe Abb. 24 A, B und C).

Die Expression von hBD-3 war selektiv in der Henle-Schicht in THF, IHF und VHF (4 von 15 Proben).

Es gab auch eine Positivität der Grenzzone bei THF, IHF und VHF (nur in 8 von 15 Proben).

In der Kutikula und dem Haarkortex konnten keine Anfärbungen beobachtet werden.

Tab. 33: Gegenüberstellung der Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Terminalhaar-, Intermediärhaar- und in Vellushaarfollikeln des Wulstes

Polyklonal. Ak	ÄWS		basale		Henle		IWS Huxley		Kutikula		Haarkortex			
	innere		THF		IHF/VHF		THF		IHF/VHF		THF		IHF/VHF	
	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	
hBD-1	0/+	0/+	+/++	0/+	++/++++	++	++/++++	++	++/+++	++	0	0	0	
hBD-2	+	+	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
hBD-3	++	++/+++*	++/+++	++	0/++	0/+++°	0	0	0	0	0	0	0	

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv, +++* = Positivität der Grenzzone in 8 von 15, +++° = Positivität in 4 von 15

Isthmus und Supraseboglandulärbereich (Tabelle 34)

Vellushaar-, Intermediärhaar- und Terminalhaarfollikel zeigten in diesem Follikelabschnitt weitgehend identische Verteilungen der Bindestellen der verwendeten β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3.

hBD-1 wurde in THF schwach in den inneren Zellschichten und mit Betonung in den basalen Zellschichten der äußeren Wurzelscheide nachgewiesen, hingegen war die Expression in VHF und IHF negativ oder schwach homogen in beiden Zellschichten der ÄWS.

In Übereinstimmung zu THF, IHF und VHF waren homogene starke Verteilungen der Bindungsstellen in beiden Anteilen der inneren Wurzelscheide mit hBD-1 zu sehen.

hBD-2 zeigte ein ähnliches homogenes schwaches Verhalten in den Zellen der äußeren Wurzelscheide von IHF und VHF, während in THF eine schwache bis deutliche Darstellung der inneren Zellen und eine Betonung der basalen Zellen feststellbar waren.

In der ÄWS fanden die drei Follikeltypen Bindungsstellen.

Als Marker für die gesamte IWS ergibt sich eine negative Anfärbung sowohl für den VHF als auch für den IHF und THF bei hBD-2.

hBD-3 wurde negativ bis schwach in den Innenzellen sowie schwach bis deutlich in den Basalzellen von THF exprimiert, während VHF und IHF identische Verhaltensmuster in beiden Anteilzellen der ÄWS aufwiesen.

Die Expression im Bereich der IWS des THF, IHF und VHF (nur in 3 von 15 Proben) ist für die ausgewerteten hBD-3 in der Henle-Schicht positiv.

Der Befund ist in der Abb. 24 G, H und I zu ersehen.

Tab. 34: Gegenüberstellung der Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaar-, Intermediärhaar- und Vellushaarfollikel im Isthmus sowie im supraseboglandulären Bereich

Polyklonal. Ak	ÄWS				IWS			
	innere		basale		Henle		Huxley	
	THF	IHV/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF
hBD-1	0	0/+	+	0/+	++	++	++/+++	++
hBD-2	+	+	+/++	+	0	0	0	0
hBD-3	0/+	++	+/++	++	++ ^o	0/++	0	0

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

++^o = Positivität in 3 von 15 Proben

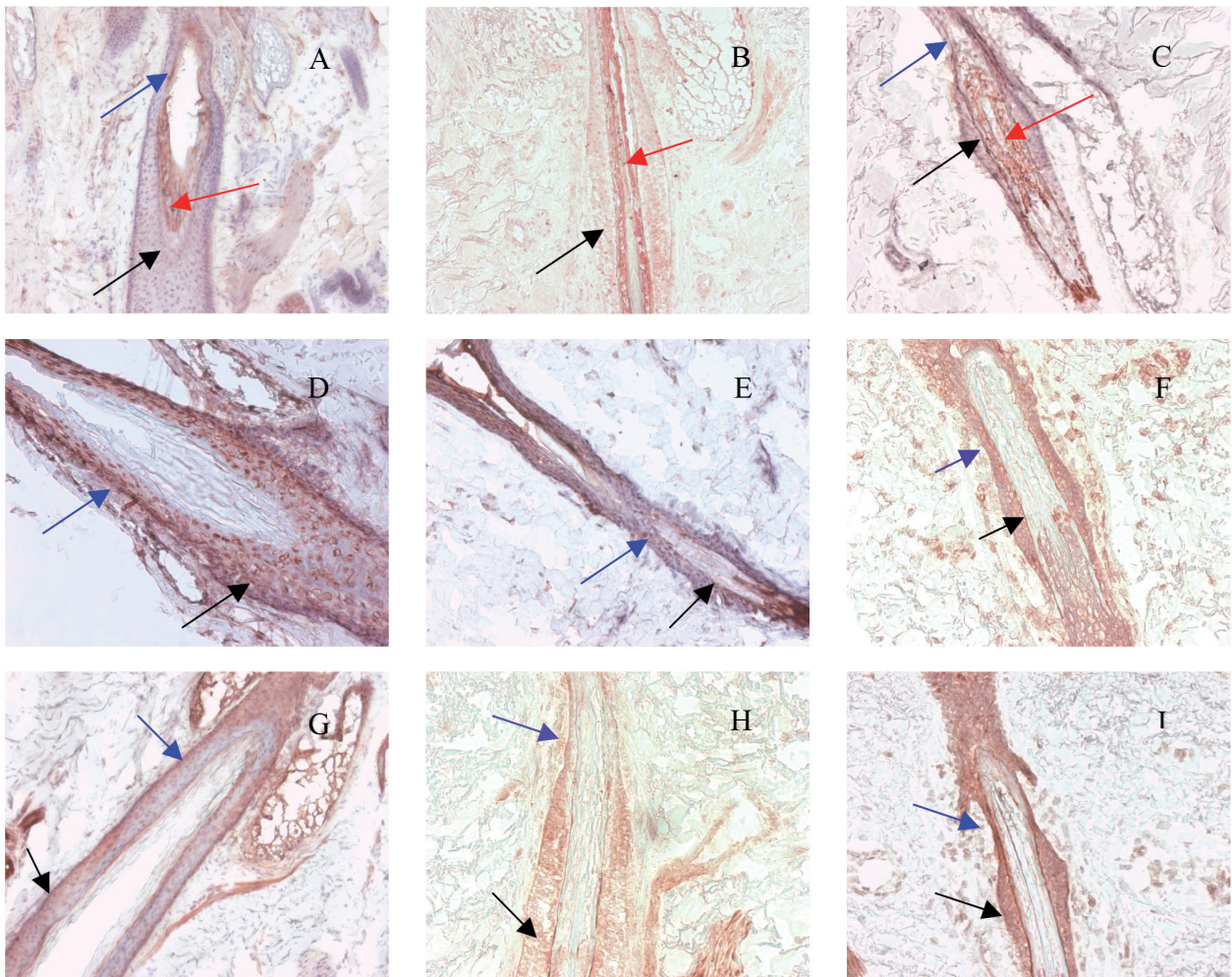


Abb. 24: Gegenüberstellung des unterschiedliche Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensinen hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Isthmus und Wulst der drei Haartypen

- | | |
|----------------------------|-------------|
| A) Terminalhaarfollikel | hBD-1 (x20) |
| B) Intermediärhaarfollikel | hBD-1 (x20) |
| C) Vellushaarfollikel | hBD-1 (x20) |
| D) Terminalhaarfollikel | hBD-2 (x10) |
| E) Intermediärhaarfollikel | hBD-2 (x20) |
| F) Vellushaarfollikel | hBD-2 (x20) |
| G) Terminalhaarfollikel | hBD-3 (x10) |
| H) Intermediärhaarfollikel | hBD-3 (x20) |
| I) Vellushaarfollikel | hBD-3 (x20) |

Die Pfeile zeigen in A, B und C die IWS mit roter Farbe, mit blauer Farbe in allen Abb. den Isthmus und mit schwarzer Farbe in allen Abb. den Wulst.

Infundibulum (Tabelle 35)

In diesem Follikelbereich stellte sich die Verteilung der Bindungsstellen für die untersuchten β -Defensine mit einigen Ausnahmen gradueller Art nahezu identisch dar.

In der gesamten äußeren Wurzelscheide zeigten die hBD-2 und hBD-3 eine deutliche, ähnlich regelmäßige Expression, hBD-1 war schwach bis positiv in den inneren Zellen von THF, IHF und VHF, während die drei Haartypen eine negative oder schwache Intensität mit hBD-1 in den basalen Zellen aufwiesen.

Alle β -Defensine zeigten eine starke Expression im Stratum corneum der drei Haartypen (siehe Abb. 25).

Tab. 35: Gegenüberstellung der Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaar-, Intermediärhaar- und im Vellushaarfollikel des Infundibulum

Polyklonal. Ak	innere		basale	
	THF	IHF/VHF	THF	IHF/ VHF
hBD-1	+ / ++	+ / +++	0 / +	0 / +
hBD-2	++	+ / +++	++	+ / +++
hBD-3	++	+ / +++	++	+ / +++

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

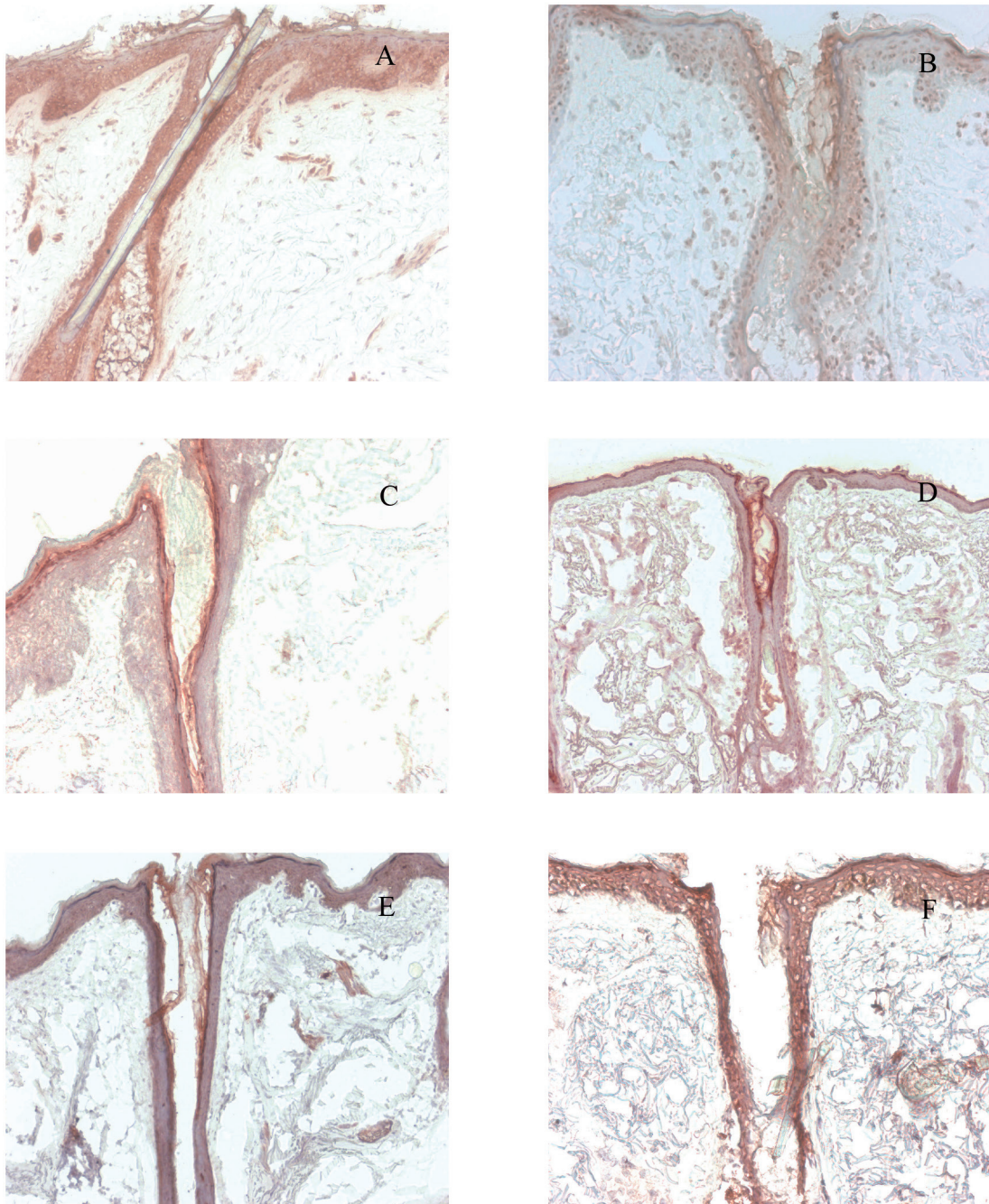


Abb. 25: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Infundibulum der Terminal- und Vellushaarfollikel

- | | |
|-------------------------|-------------|
| A) Terminalhaarfollikel | hBD-1 (x10) |
| B) Vellushaarfollikel | hBD-1 (x20) |
| C) Terminalhaarfollikel | hBD-2 (x10) |
| D) Vellushaarfollikel | hBD-2 (x20) |
| E) Terminalhaarfollikel | hBD-3 (x10) |
| F) Vellushaarfollikel | hBD-3 (x20) |

Talgdrüse (Tabelle 36)

Die Talgdrüse des Gesichtshautbereiches, also des Vellushaarfollikelapparates, ähnelt der des Kopfhautbereiches, d. h. des Terminalhaarfollikelapparates, in der Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3.

In den Talgdrüsen des THF, IHF und VHF wurde hBD-1 in den basalen Zellen schwach exprimiert, während in den inneren Zellen keine Anfärbung nachgewiesen werden konnte und sich eine Expression nur schwach im Ductus zeigte.

Eine Anfärbung der gesamten Talgdrüse erfolgte mit gleichen Verteilungen sowohl im Vellushaar- als auch im Intermediärhaar- und Terminalhaarfollikelapparat mit verschiedener Intensität für hBD-2 und hBD-3.

Für hBD-2 fand in den undifferenzierten basalen Zellen in THF, VHF und IHF eine positive Expression statt, während es in den differenzierten Zellen in VHF und IHF schwach bis positiv und in THF schwach exprimiert wurde.

Alle drei Follikeltypen wiesen bei hBD-3 eine positive bis starke basale Expression auf.

In den inneren Zellen konnte sie nur schwach bis deutlich beobachtet werden.

Das Talgdrüsengangepithel der drei Follikeltypen wurde mit hBD-3 sehr stark angefärbt.

Insgesamt lassen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Talgdrüsen des Vellushaar-, Intermediärhaar- und Terminalhaarfollikels feststellen, wie auch die folgende Tabelle verdeutlicht.

Tab. 36: Gegenüberstellung des immunhistochemischen Färbeverhaltens der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Talgdrüse des Terminalhaar-, Intermediärhaar- und Vellushaarfollikels

Polyklonal. Ak	basale/undifferenzierte Zellen		innere/differenzierte Zellen		Ductus	
	THF	VHF/VHF	THF	IHF/ VHF	THF	IHF/VHF
hBD-1	+	+	0	0	0/+	0/+
hBD-2	++	++	+	+/>++	++/>+++	+++
hBD-3	+++	+++	+/>++	+/>++	+++	+++

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

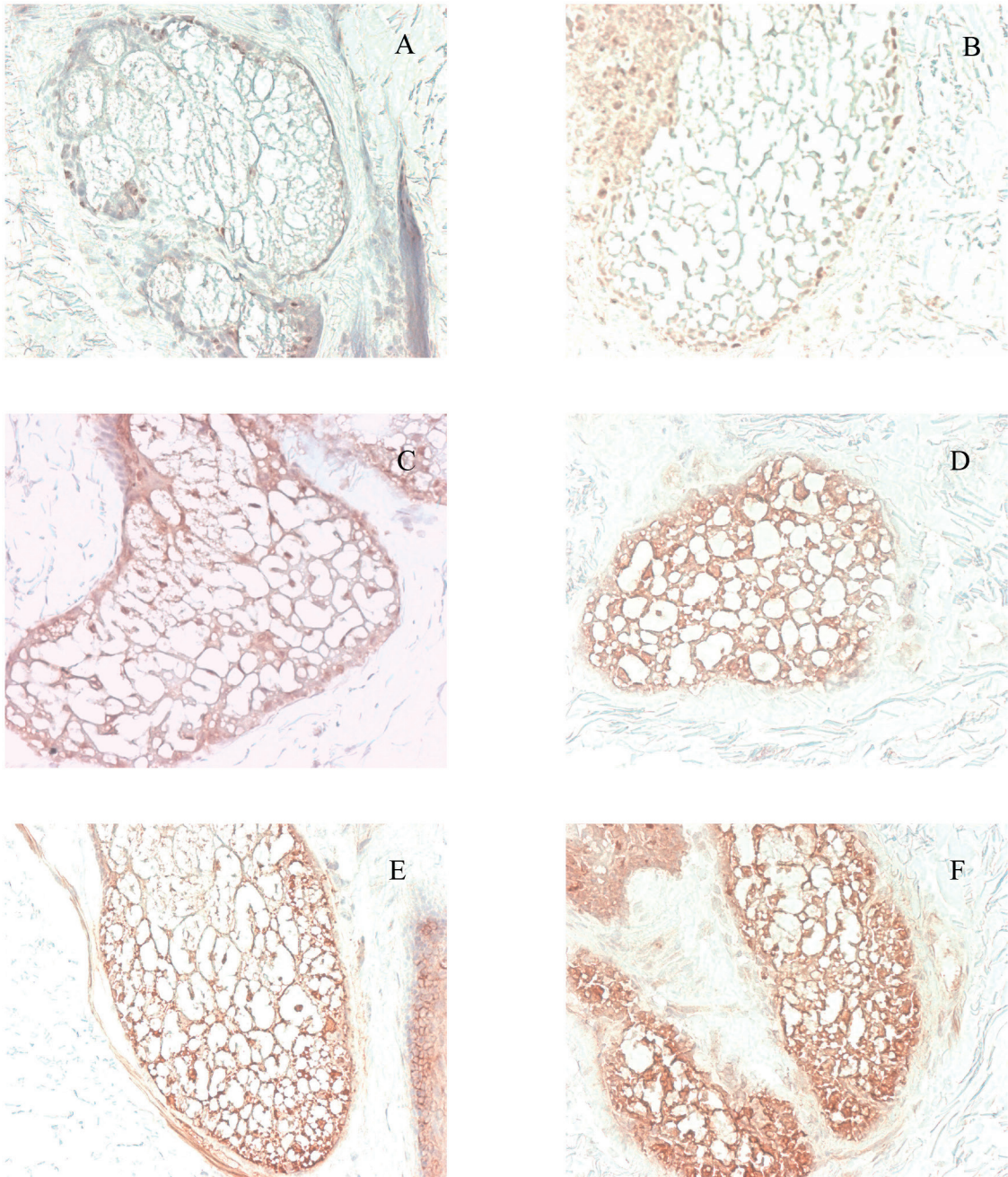


Abb. 26: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Talgdrüse von Terminal- und Vellushaarfollikeln

- | | |
|-------------------------|-------------|
| A) Terminalhaarfollikel | hBD-1 (x20) |
| B) Vellushaarfollikel | hBD-1 (x20) |
| C) Terminalhaarfollikel | hBD-2 (x20) |
| D) Vellushaarfollikel | hBD-2 (x20) |
| E) Terminalhaarfollikel | hBD-3 (x20) |
| F) Vellushaarfollikel | hBD-3 (x20) |

3.2.1 Gegenüberstellung des immunhistochemischen Färbeverhaltens der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Schweißdrüse (Tabelle 37)

Die drei β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 zeigten in den ekkrinen Schweißdrüsen meistens eine Positivität, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Die Expression bei hBD-3 war sehr stark, bei hBD-2 deutlich und bei hBD-1 schwach bis deutlich (einige Drüsen sind komplett negativ, die meisten jedoch positiv; eventuell hängen diese Unterschiede der Expression vom Aktivitätsgrad der Drüse ab).

Tab. 37: Gegenüberstellung des immunhistochemischen Färbeverhaltens der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Schweißdrüse

Polyklonal. Ak	THF	IHF	VHF
hBD-1		0/+	++
hBD-2		++	++++
hBD-3		+++	

0 = negativ, -/+ = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv

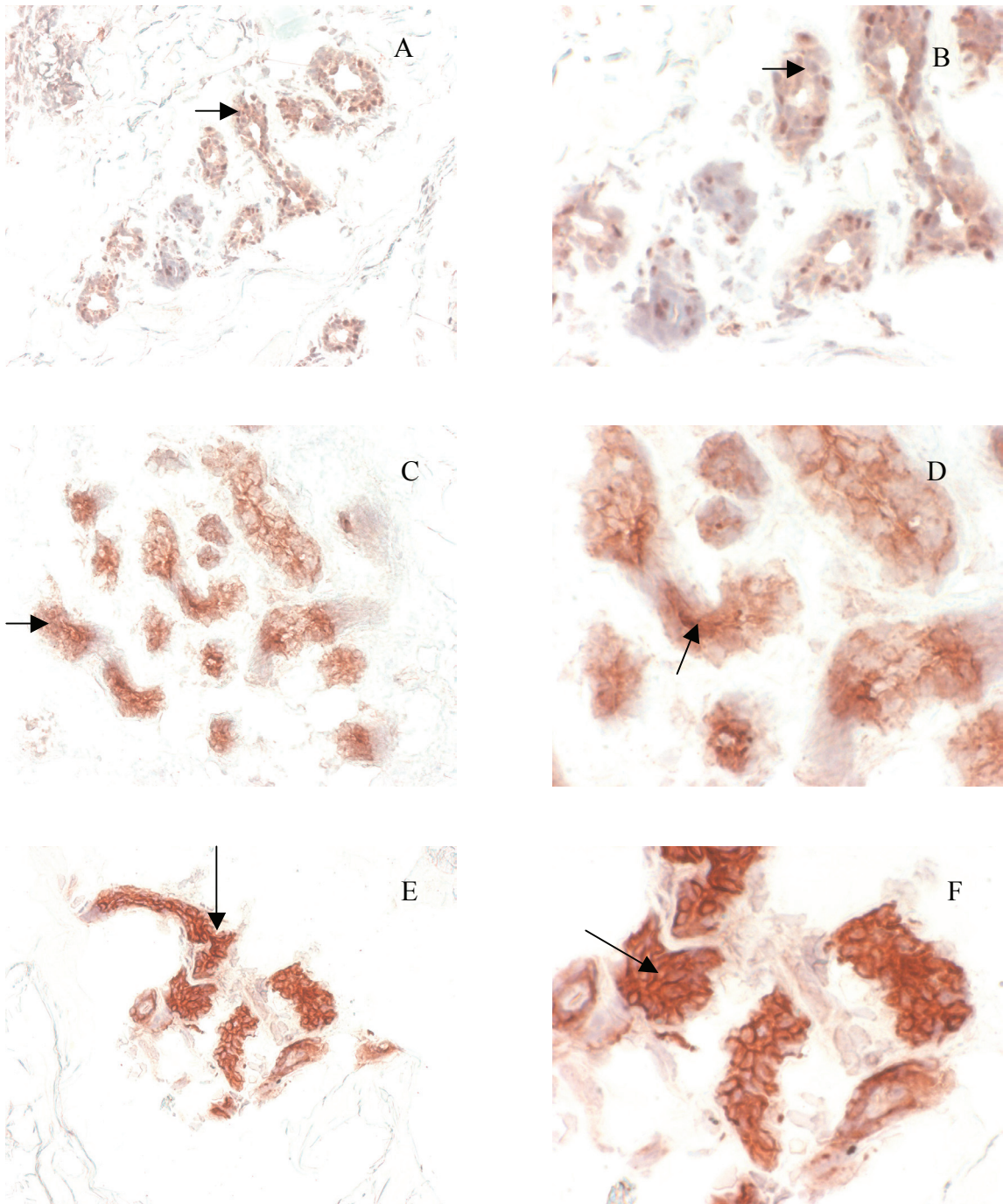


Abb. 27: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Schweißdrüse

A) und B) Die Schweißdrüse mit hBD-1 (x20) und B (x40)

C) und D) Die Schweißdrüse mit hBD-2 (x20) und D (x40)

E) und F) Die Schweißdrüse mit hBD-3 (x20) und F (x40)

Die Pfeile zeigen in A und B eine schwache oder negative, in C sowie in D eine positive, in E sowie in F eine starke positive Anfärbung.

3.3 Besonderheiten (Tabelle 38)

Die Untersuchungen zeigten in den verschiedenen Bereichen des Terminalhaar-, des Intermediärhaar- und des Vellushaarfollikels einzelne besondere Expressionsmuster.

Anders als in VHF war die Medulla in THF in 4 von 11 Fällen deutlich exprimiert, deutlich positiv für hBD-2 (siehe Abb. 28 C, D) und schwach positiv für hBD-1 (siehe Abb. 28 A, B).

Eine unregelmäßige Anfärbung der IWS (Huxley-Schicht) von THF für hBD-2 zeigte sich in 3 von 11 Proben (siehe Abb. 28 E, F).

Die fibröse Hülle im Bereich des Wulstes und der suprabulbären Region der ÄWS (oberes Drittel) weist in THF eine eigenständige Differenzierung auf. Es konnte eine selektive Anfärbung mit anti-hBD-3 in diesem Bereich in 9 von 11 Proben gezeigt werden (siehe Abb. 29 A, B).

In der ÄWS des suprabulbären Bereiches fällt das unterschiedliche Expressionmuster des hBD-3 auf, in THF zeigt es eine basale Betonung in 4 von 11 Proben, ebenso in VHF in 6 von 15 Proben (siehe Abb. 29 F, G). Zudem gab es auch in anderen Schnitten eine komplette Anfärbung der ÄWS des suprabulbären Bereiches in allen Haartypen (siehe Abb. 29 C, D und E).

Tab. 38: Auffälliges Expressionsverhalten der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in den verschiedenen Anteilen/Schichten des Terminalhaarfollikel- (THF) und Vellushaarfollikelapparates (VHF)

Polyklonal. Ak	Medulla		fibröse Hülle				suprabulbärer Bereich			
	Wulst		suprabulbärer B.		basale Betonung		komplette Anfärbung der AWS			
	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF	THF	IHF/VHF		
hBD-1	++	0	0	0	0	0	0	0	0	
hBD-2	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	
hBD-3	0	0	+++	0	+++*	0	+++°	+++	+++	

0 = negativ, +/- = unregelmäßige Anfärbung, + = schwach, ++ = positiv, +++ = stark positiv, +++* = Positivität im oberen Drittel des Suprabulbärbereichs, +++° = Positivität in (4/11) in THF und (6/15) in VHF

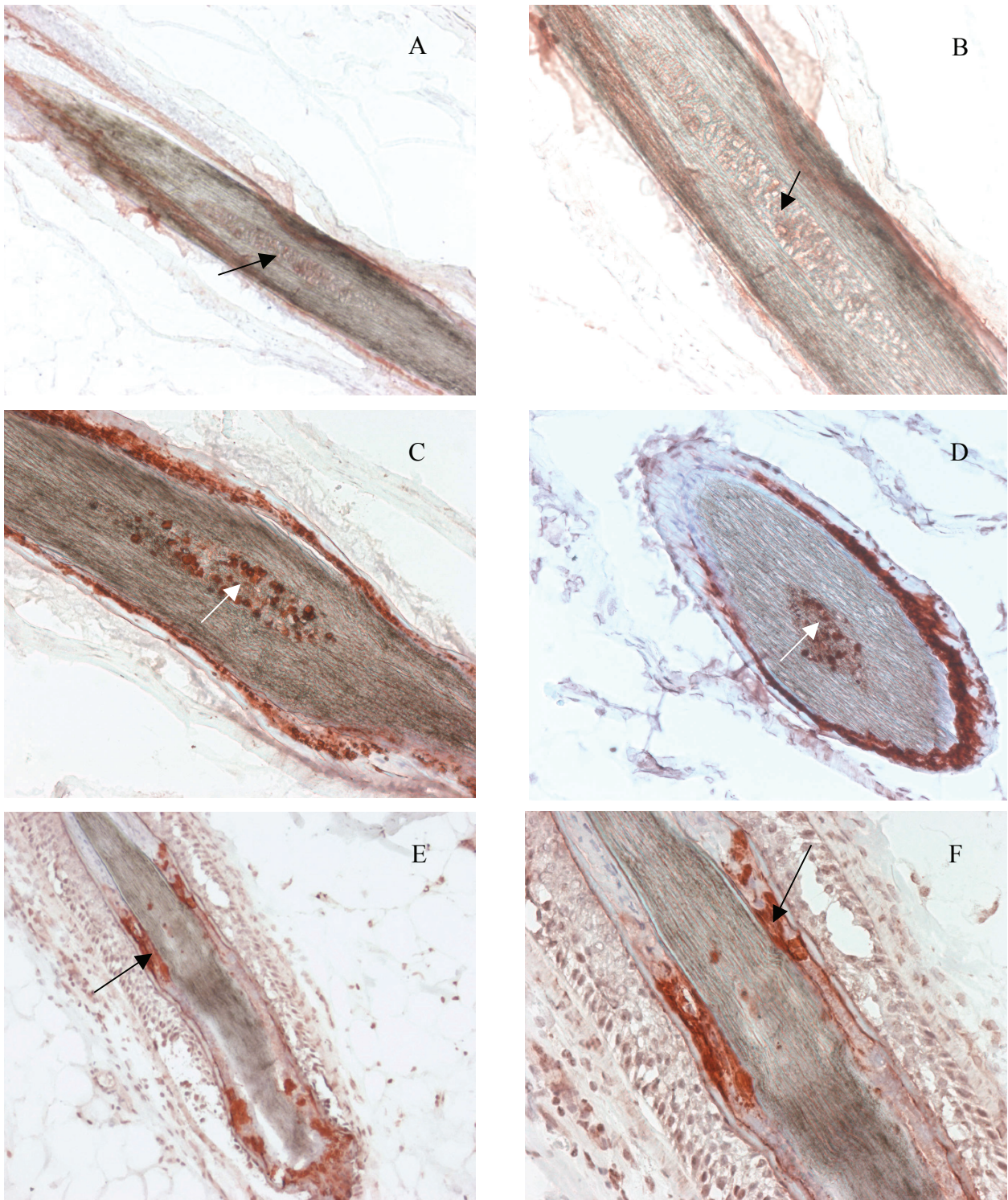


Abb. 28: Auffälliges Expressionsverhalten der β -Defensine hBD-1 und hBD-2

Die Pfeile zeigen in:

A) und B) positive Medulla im Suprabulbärbereich des THF hBD-1 (x10) und (x20)

C) und D) positive Medulla im Suprabulbärbereich des THF hBD-2 (x10) und (x20)

E) und F) unregelmäßige Anfärbung der Henle-Schicht der IWS hBD-2 (x10) und (x20)

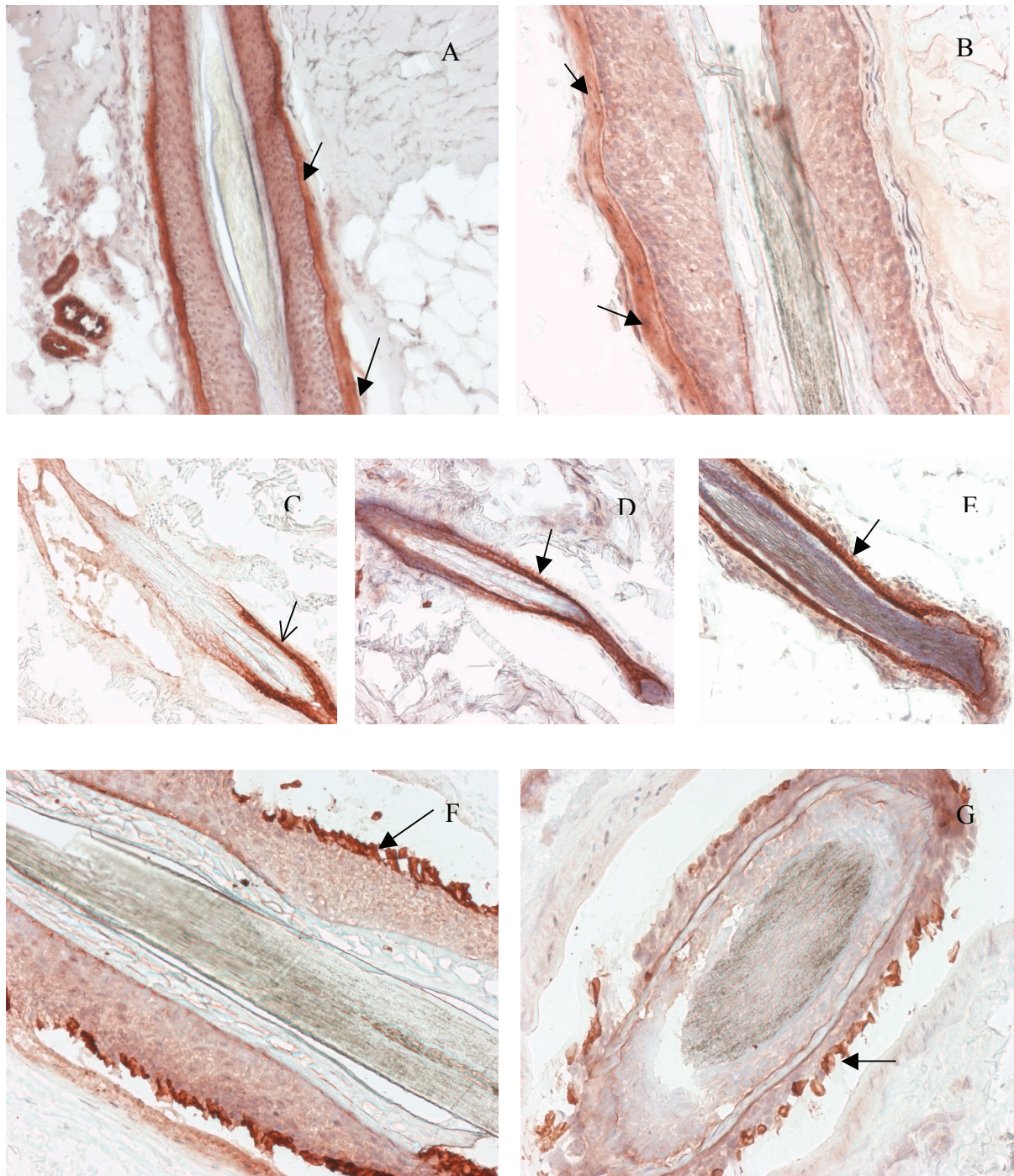


Abb. 29: Auffälliges Expressionsverhalten der β -Defensine hBD-3

Die Pfeile zeigen in:

A) und B) positive fibröse Hülle des Terminalhaarfollikels hBD-3 (x10) und (x20)

C) Vellushaarfollikel, D) Intermediärhaarfollikel und E) Terminalhaarfollikel

Die drei Haartypen zeigten eine komplette Anfärbung der ÄWS im suprabulbären Bereich mit hBD-3 (x20).

F) und G) zeigen eine basale Betonung des Terminalhaarfollikels hBD-3 (x10) und Querschnitte (x20)

3.4 Immunfluoreszenz

Um die Ergebnisse der konventionellen Färbung mittels der Immunfluoreszenzmethode zu überprüfen, wurden an THF-Schnitten mit anti-hBD-1-, -hBD-2- und -hBD-3 die Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Die Abbildungen repräsentieren Immunreaktivitätsmuster der Analyse von mindestens 27 longitudinal geschnittenen Terminalhaarfollikeln (THF) der Kopfhaut, auf welchen in 6 verschiedenen Proben hBD-1 = 16, hBD-2 = 7 und hBD-3 = 4 angefärbt wurden.

Abkürzungen: IR = Immunreaktivität, IWS und ÄWS = innere und äußere Wurzelscheide, SB = Suprabulbärbereich.

Eine spezifische Expressionsverteilung konnte mit den β -Defensinen hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Haarfollikel sowie in der Epidermis beobachtet werden.

Abbildungen: grüne Farbe = grüne Fluoreszenz, rote Farbe = Überlappung von unspezifischer Fluoreszenz und grüner Fluoreszenz, hellgrün = unspezifische Fluoreszenz.

Es muss darauf hinweisen werden, dass die Abb. 30 A, D und G; 31 A, D und G; 32 A und D jeweils digitale Überlagerungen der Fluoreszenz zeigen. Im Vergleich zu den Nativbildern wird so eine anatomisch genaue Bestimmung der Expression ermöglicht.

Epidermis: Die Lokalisation der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 bei der Fluoreszenz-Mikroskopie zeigte, dass der größte Anteil sich im Stratum corneum und Stratum germinativ befindet (siehe Abb. 30).

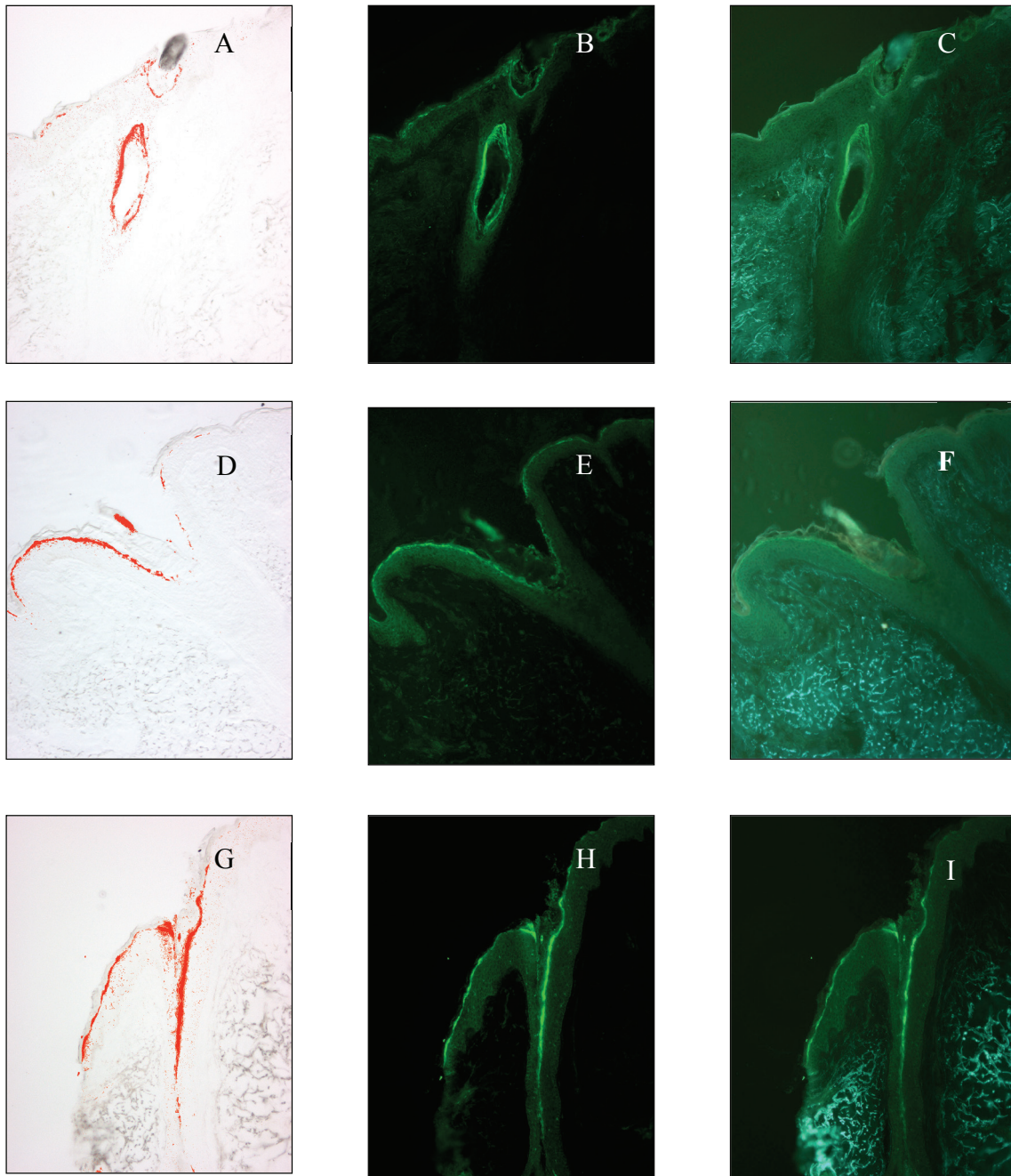


Abb. 30: β -Defensin-Immunreaktivität in Epidermis und distalen Terminalhaarfollikeln

A), B) und C) Epidermis und Infundibulum hBD-1

D), E) und F) Epidermis und Infundibulum hBD-2

G), H) und I) Epidermis und Infundibulum hBD-3

Die Untersuchung der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 mittels der Immunfluoreszenzmethode ergab ein besonderes Expressionsmuster. Es ist offensichtlich, dass die überwiegende Menge der β -Defensine mit unterschiedlicher Verteilung in THF vorhanden ist.

a) hBD-1

Es zeigte sich in der gesamten inneren Wurzelscheide des Haarfollikels ein ähnlich starkes Expressionsmuster, in beiden Schichten des suprabulbären Bereiches konnte eine Expression jedoch nur Henle-Schicht nachgewiesen werden.

Im Bulbusbereich gab es keine Immunreaktivität (siehe Abb. 31 A, B und C).

In der äußeren Wurzelscheide von Suprabulbärbereich, Isthmus und Wulst konnte jeweils nur eine schwache bzw. keine Expression nachgewiesen werden.

Nur im mittleren und oberen Drittel des suprabulbären Bereiches war eine leichte Betonung in den basalen Zellen (Abb. 31 C und F) zu erkennen.

Im Infundibulum konnte hinsichtlich der drei β -Defensine eine starke Positivität im Stratum corneum der ÄWS beobachtet werden (siehe Abb. 30 A, B und C).

Der Befund ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

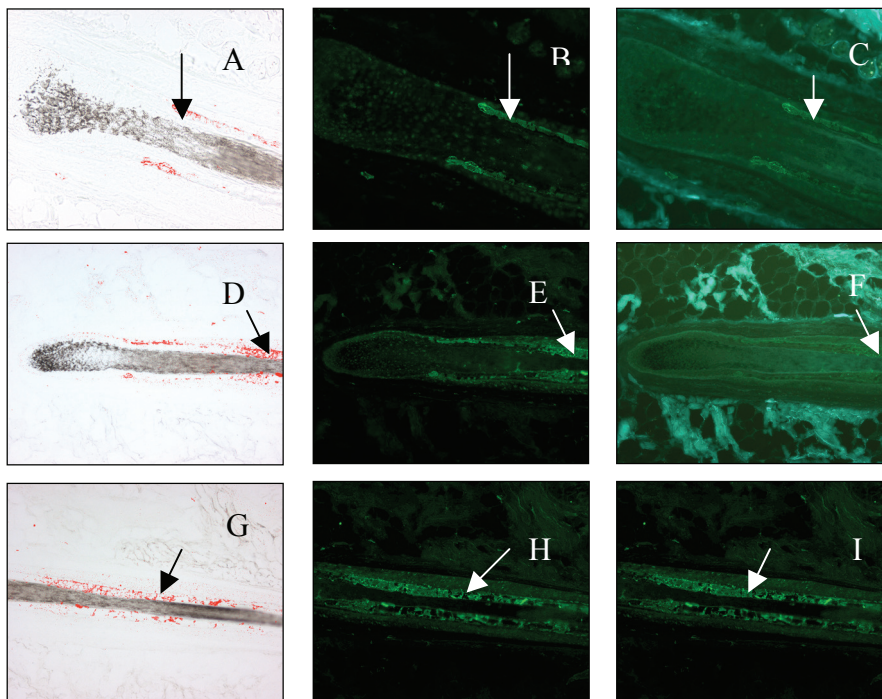


Abb. 31: hBD-1-Immunreaktivität im Suprabulbärbereich (SB)

Die Pfeile zeigen:

A), B) und C) Im unteren Drittel des SB ist die Henle-Schicht positiv.

D), E) und F) Im mittleren Drittel des SB sind beide Anteile der IWS positiv.

G), H) und I) Ab mittlerem Drittel des SB sind beide Anteile der IWS positiv.

b) hBD-2

Die Immunreaktivität mit hBD-2 wurde bei der inneren Wurzelscheide (Huxley-Schicht) positiv (Abb. 32 A, B und C), sowohl im unteren als auch im mittleren Drittel des Suprabulbärbereiches und des Bulbus, beobachtet, hingegen ist die Positivität im Bulbus in beiden Schichten der IWS nachgewiesen worden, hier war die Expression am intensivsten.

In der inneren Wurzelscheide des Isthmus, im Wulst und im oberen Drittel des Suprabulbärbereiches zeigte sich wie in den Innenzellen der äußeren Wurzelscheide der gleichen Regionen keine Expression. Mit Ausnahme des Suprabulbärbereiches fand eine leichte Betonung in den Basalzellen der ÄWS statt (siehe Abb. 32 E).

Die Medulla konnte mit hBD-2 dargestellt werden.

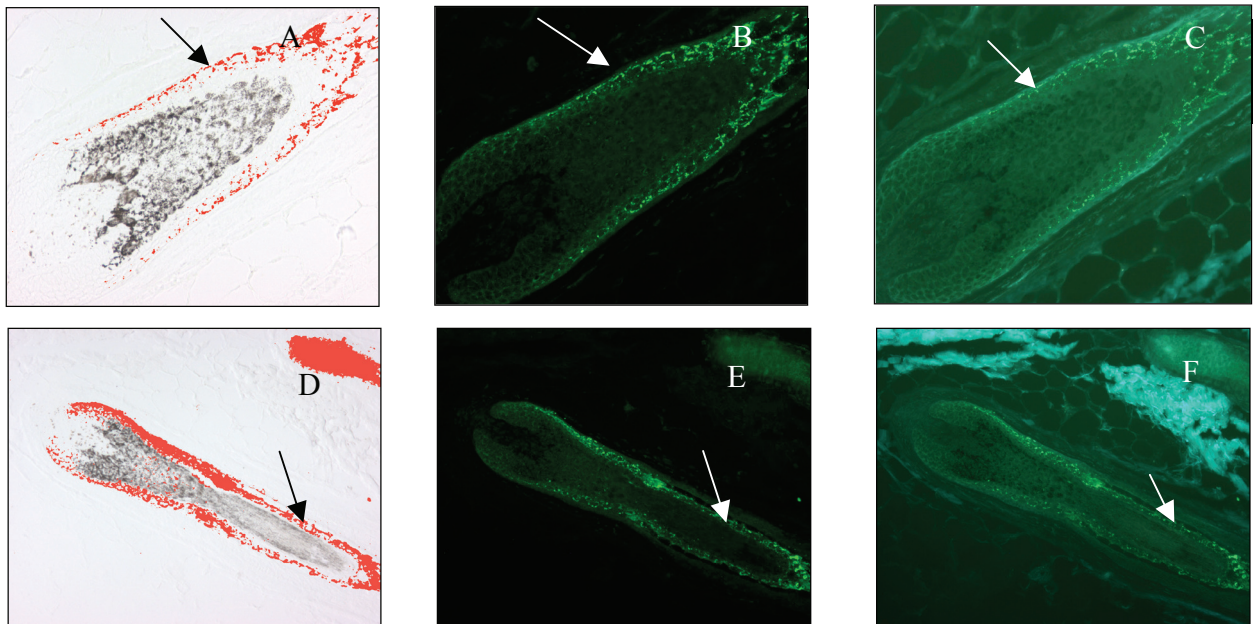


Abb. 32: hBD-2-Immunreaktivität im Bulbus- und Suprabulbärbereich von Terminalhaarfollikeln

Die Pfeilen zeigen in:

A), B) und C) Positivität in der IWS des Bulbusbereiches

D), E) und F) Positivität in der Huxley-Schicht des Suprabulbärbereiches

c) hBD-3

Die Intensitätsexpression dieses β -Defensins war sehr positiv in beiden inneren Wurzelscheiden des Bulbus, jedoch nur in der Huxley-Schicht des suprabulbären Bereiches (unteres bis mittleres Drittel), ähnlich dem Expressionsmuster bei hBD-2. Die Reaktivität setzte sich nur in der Grenzzone des gesamten Suprabulbärbereiches bis zum Wulst fort (siehe Abb. 33 A, B, C, D, E und F).

Ab mittlerem und oberem Drittel des suprabulbären Bereiches steigerte sich die Intensität der hBD-3 bis zum Wulst in den mittleren Zellen und zeigte eine geringe Betonung in den basalen Zellen der ÄWS, hingegen reduzierte sich das hBD-3 im distalen Haarfollikel.

Als herausragender Befund konnten ein mäßiges Immunreaktivitätsverhalten im Wulstbereich der ÄWS und zudem eine starke Expression innerhalb derselben Region, in der Henle-Schicht der IWS, dargestellt werden (siehe Abb. 33 G, H und I).

In einigen Schnitten konnte eine starke Immunreaktivität in den basalen Zellen des suprabulbären Bereiches konstatiert werden (siehe Abb. 34 D, E und F).

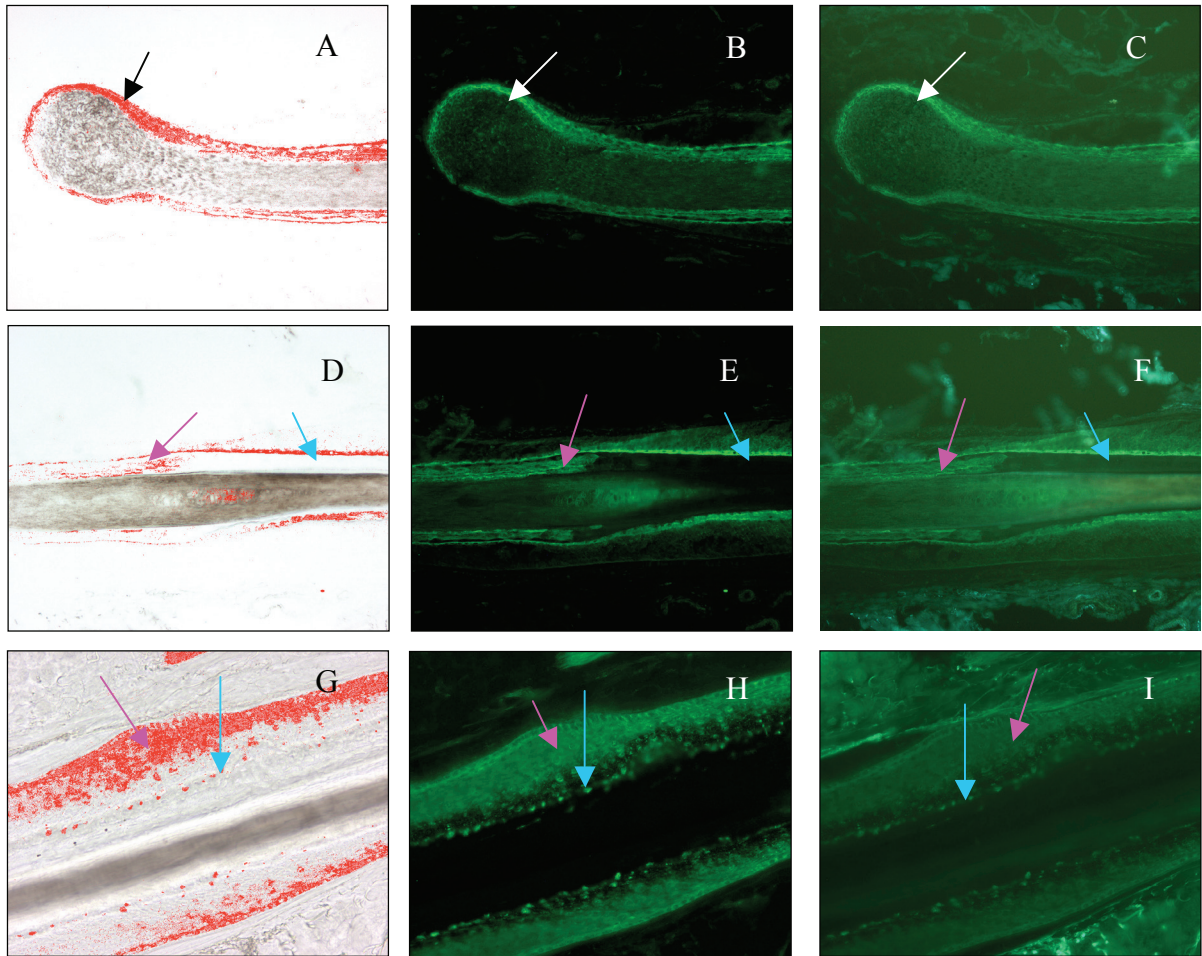


Abb. 33: hBD-3-Immunreaktivität im Bulbus-, im Suprabulbär- und im Wulstbereich des Terminalhaarfollikels

Die Pfeile zeigen in:

A), B) und C) Immunreaktivität in der IWS des Bulbusbereiches

D), E) und F) Immunreaktivität in der Huxley-Schicht des Suprabulbärbereiches (unteres und mittleres Drittel) mit rosa Farbe und in der Grenzzone des gesamten Suprabulbärbereiches mit hellblauer Farbe

G), H) und I) Immunreaktivität in den basalen und mittleren Zellen der ÄWS mit rosa Farbe und in der Henle-Schicht der IWS im Wulst mit hellblauer Farbe

3.4.1 Besonderheit der Immunfluoreszenz

Bei hBD-2 konnte eine positive Anfärbung in der Medulla im gesamten suprabulbären Bereich beobachtet werden, diese hatte ein Pünktchenmuster (siehe Abb. 34 A, B und C). Ähnliches wurde bei hBD-1 und hBD-3 nicht nachgewiesen.

In einigen Schnitten wurde hBD-3 als starke Immunreaktivität in basalen Zellen des Suprabulbärbereiches exprimiert (siehe Abb. 34 D, E und F).

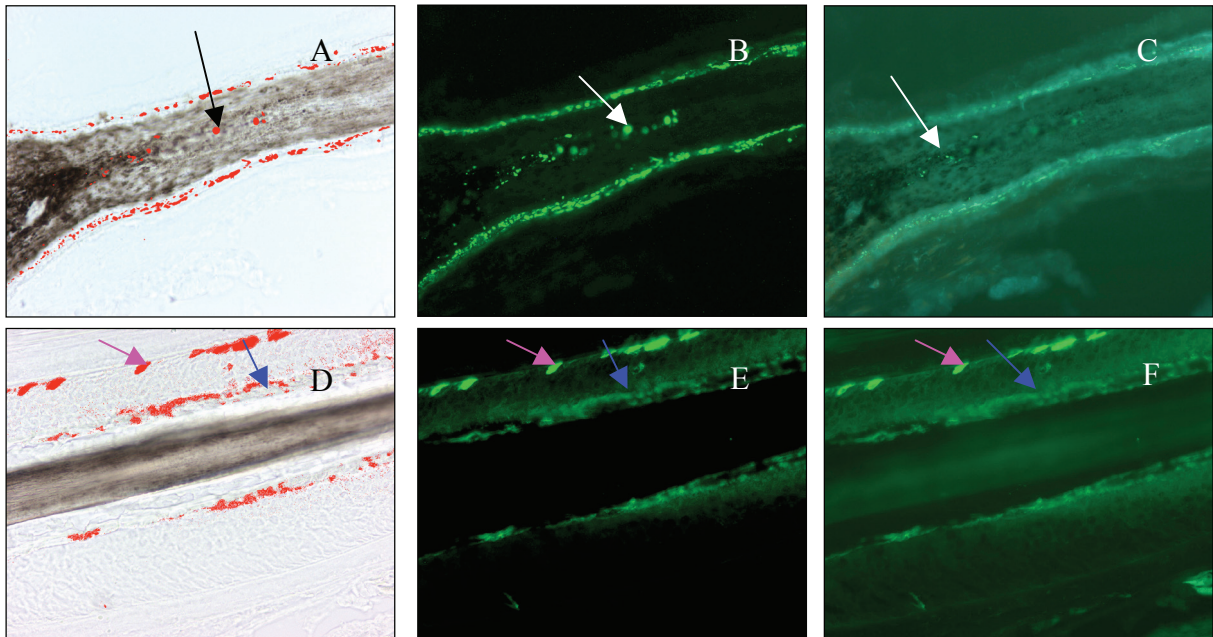


Abb. 34: Besonderheit der Immunfluoreszenz

Die Pfeile zeigen in:

A), B) und C) Immunreaktivität der Medulla (hBD-2)

D), E) und F) mit rosa Farbe starke Immunreaktivität in den basalen Zellen der ÄWS, mit blauer Farbe die Grenzzone im Suprabulbärbereich (hBD-3)

3.4.2 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Immunfluoreszenz (Tabelle 39)

Die drei β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 hatten eine positive Immunreaktivität in der Epidermis und dem Infundibulum. Während sich die äußere Wurzelscheide des Wulstes nur mit hBD-3 positiv zeigte, konnte hBD-2 aufgrund fehlender Expression nicht ausgewertet werden. hBD-1 wies keine Reaktion auf.

Der Isthmus zeigte eine schwache Reaktion mit hBD-3 in der äußeren Wurzelscheide und konnte mit hBD-2 und hBD-1 nicht ausgewertet werden.

In der inneren Wurzelscheide des Suprabulbärbereiches wurde mit den drei β -Defensinen eine positive Reaktion gezeigt, aber mit unterschiedlichen Verteilungen.

In der äußeren Wurzelscheide des Suprabulbärbereiches zeigte sich eine Positivität nur bei hBD-3, die Expression war schwach bei hBD-2 und schwach oder ohne Reaktion bei hBD-1.

Die innere Wurzelscheide des Bulbus zeigte bei hBD-2 und hBD-3 eine Immunreaktivität, jedoch keine Reaktion bei hBD-1.

Die Medulla war positiv bei hBD-2.

Tab. 39: Zusammenfassung der Untersuchungen zur Immunfluoreszenz

β -Defensine		hBD-1	hBD-2	hBD-3
Epidermis		+	+	+
Bulbus	IWS	-	+	+
	ÄWS	-	-	-
	DP	-	-	-
	Matrix-Zellen	-	-	-
Suprabulbärbereich	IWS	+	+	+
	ÄWS	-	+/-	+
Wulst		-	n. a.	+
Isthmus		n. a.	n. a.	+/-
Infundibulum		+	+	+
Medulla		-	+	-

DP: dermale Papille

+ = positive Reaktion; - = keine Reaktion; +/- = schwache Reaktion; n. a. = nicht ausgewertet

3.5 Vergleich zwischen Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Bei beiden Methoden konnten mit den drei β -Defensinen ähnliche Expressionsmuster in den Terminalhaarfollikeln beobachtet werden, wie die folgenden Abbildungen zeigen.

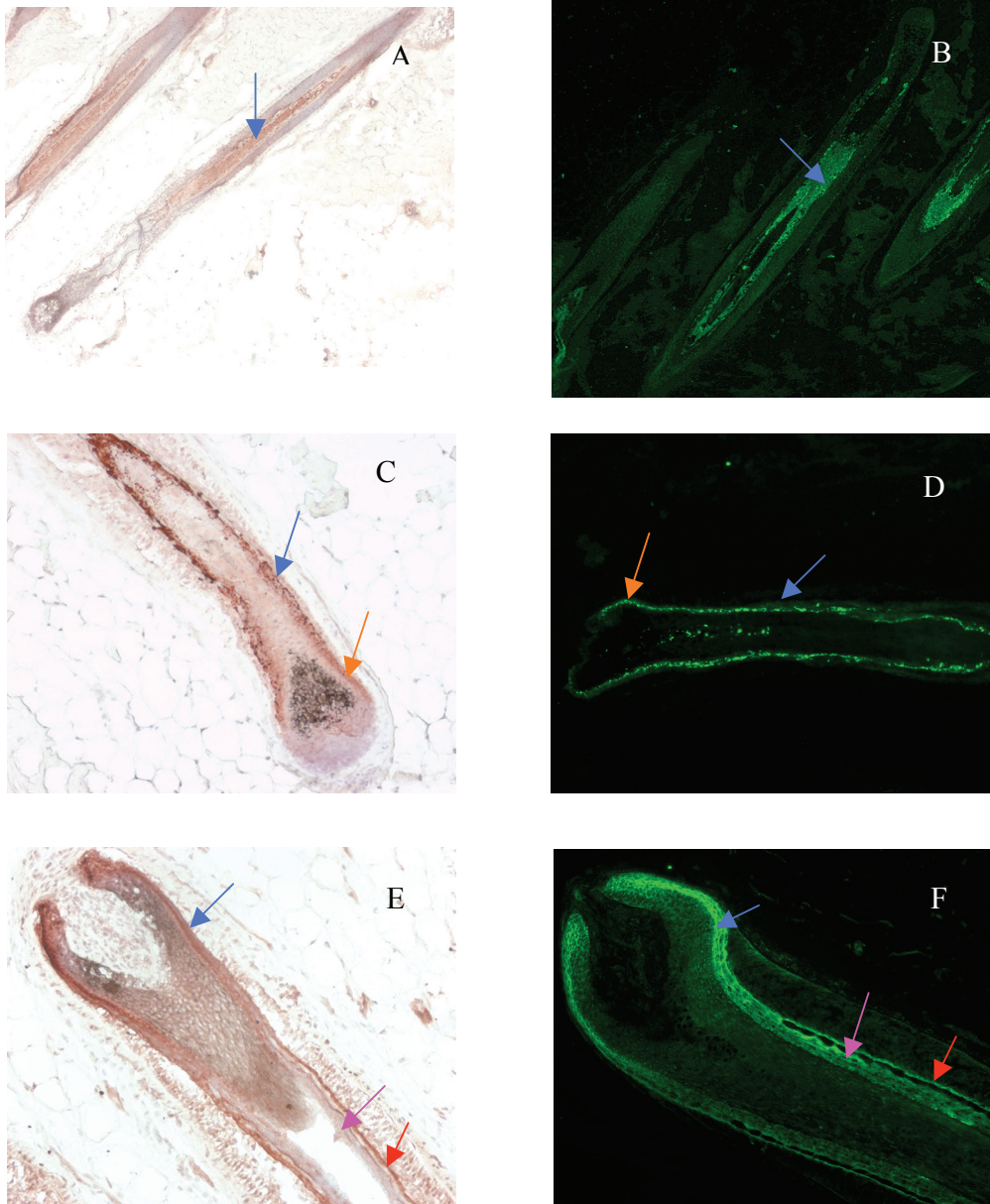


Abb. 35: Vergleich zwischen Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

- A) Terminalhaarfollikel hBD-1 Immunhistochemie (x4)
- B) Terminalhaarfollikel hBD-1 Immunfluoreszenz (x4)
- C) Terminalhaarfollikel hBD-2 Immunhistochemie (x10)
- D) Terminalhaarfollikel hBD-2 Immunfluoreszenz (x10)
- E) Terminalhaarfollikel hBD-3 Immunhistochemie (x10)
- F) Terminalhaarfollikel hBD-3 Immunfluoreszenz (x10)

Die Pfeile zeigen in A und B: IWS positiv, C und D: mit blauer Farbe die Huxley-Schicht positiv im suprabulbären Bereich, mit orangener Farbe die IWS des Bulbus positiv, E und F: mit rosa Farbe die Huxley-Schicht positiv, mit roter Farbe die Grenzzone positiv, mit blauer Farbe die IWS des Bulbus positiv

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 konnte in allen untersuchten Haarfollikelapparaten (follikuloseboglanduläre Einheiten) mittels Immunhistochemie und mittels Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden.

Haarfollikel (THF und VHF gleich):

- Eine starke Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurde sowohl im Stratum corneum der interfollikulären Epidermis als auch im Hornmaterial von THF und VHF gefunden.
- Die mäßige homogene Expression der β -Defensine im Bereich der gesamten äußeren Wurzelscheide des Infundibulum des VHF entspricht prinzipiell der Expression bei THF, außerdem ist eine starke Anfärbung im Stratum corneum nachweisbar.

Haarfollikel (THF und VHF unterschiedlich):

- In Isthmus-, Supraseboglandulär- und Wulst-Bereich finden sich unterschiedliche Defensin-expressionsmuster des Vellushaarfollikels und des Terminalhaarfollikels. In VHF und IHF zeigte sich eine schwache, homogene Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 mit verschiedener Intensität, hingegen waren in THF unterschiedliche Verteilungen mit basaler Betonung der ÄWS feststellbar.
- In der inneren Wurzelscheide des Haarfollikels wurden maximal die drei β -Defensine aller Haartypen exprimiert, aber mit unterschiedlichen Verteilungen.

Als Marker der Talgdrüse lassen sich entsprechend ähnliche Expressionsmuster aller β -Defensine feststellen, in THF, IHF und VHF aber mit unterschiedlicher Intensität (hBD-1 schwach, hBD-2 mäßig und hBD-3 stark).

Zusätzlich konnte bei der Auswertung der Färbung von ekkrinen Schweißdrüsen festgestellt werden, dass diese stark mit hBD-3, mäßig mit hBD-2 und schwach mit hBD-1 angefärbt wurden.

hBD-1

hBD-1 wurde nicht im Bulbus des THF als auch in dem des IHF und VHF exprimiert.

hBD-2 und hBD-3

Es gab eine maximale Expression in beiden Anteilen der inneren Wurzelscheide des Bulbus für hBD-2 und hBD-3 (THF, IHF und VHF).

hBD-3

Für hBD-3-Antikörper ist die Zunahme der Expression im proximalen Bereich des Haarfollikels auffallend.

Besonderheit

hBD-3 war positiv in der fibrösen Hülle und in der Grenzzone zu beobachten. Außerdem waren hBD-2 und hBD-1 in der Medulla positiv.

4 Diskussion

4.1 Allgemein

In der vorliegenden Untersuchung konnten β -Defensine in humanen Terminal-, Intermediär- und Vellushaarfollikeln bestätigt werden. Für alle untersuchten Haarfollikeltypen zeigte sich, dass hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in menschlichen Anagenhaarfollikeln exprimiert wurden (Abb. 36 und 37).

Dieser Nachweis der β -Defensine in Haarfollikeln stützt vorherige Aussagen, dass β -Defensine in den meisten, wenn nicht sogar in allen ein- und mehrschichtigen Epithelien (Harder et al., 1997; Ali et al., 2001) und Haarfollikelstrukturen (Chronnell et al., 2001) vorhanden sind.

Anhand von immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Färbungen konnte die Lokalisation der β -Defensine bestimmt werden. Das Verteilungsmuster der verschiedenen untersuchten β -Defensine war in den unterschiedlichen Schichten des Haarfollikels heterogen. Generell kann man sagen, dass eine Kolo-kalisation von mehreren β -Defensinen immer in Bereichen gefunden wird, die an die Umwelt bzw. an verhornte Schichten grenzen, d. h. im Stratum granulosum des Infundibulum und in den beiden Zellschichten der Isthmusregion sowie in der distalen Region.

Des Weiteren wurde eine Lokalisation an der Grenzschicht zwischen innerer und äußerer Wurzelscheide (IWS und ÄWS) konstatiert, d. h. dort, wo die innere Zellschicht an die Henle-Schicht grenzt. β -Defensine wurden ebenfalls in den fibrösen Hüllen identifiziert. Beide Lokalisationen enthielten jeweils nur ein β -Defensin. Andere waren für zwei (Medulla und Bulbus) oder drei (z. B. innere Wurzelscheide der suprabulbären Region, Basalzellschicht der suprabulbären Region bis zur Isthmusregion) β -Defensine positiv. Eine Heterogenität der Expression der verschiedenen β -Defensine in unterschiedlichen Schichten mehrschichtiger Epithelien konnte bereits in der interfollikulären Epidermis von Menschen (dort auch in der Haut, Mundschleimhaut, im Urogenital-, Gastrointestinal- und Respirationstrakt) gezeigt werden (Schroder und Harder, 1999; Valore et al., 1998; Schnapp et al., 1998; Bals et al., 1998b). Des Weiteren wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass die Expression von β -Defensinen in verschiedenen Epithelien des Körpers unterschiedlich ist.

4.1.1 β -Defensine an den Grenzflächen zur Außenwelt

In dieser Arbeit fanden wir ebenfalls starke Expressionsmuster von β -Defensinen in der gesamten Epidermis und in der interfollikulären Epidermis mit unterschiedlicher Intensität. Ähnliche Ergebnisse gibt es in der Literatur (Huh et al., 2002; Dorschner et al., 2003; Oren et al., 2003; Poindexter et al., 2006).

Die untersuchten β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurden stark im gesamten Stratum corneum exprimiert, während sie in den suprabasalen Zellschichten sehr deutlich und in den basalen Zellschichten eher schwach waren. Die Tatsache, dass auch im Stratum granulosum eine deutliche Expression gesehen wurde, legt nahe, dass dies der Ort der Expression ist und sich dort synthetisierte β -Defensine mit einer zunehmenden Differenzierung in der Hornschicht wiederfinden, wo sie zur antimikrobiellen Verteidigung beitragen, β -Defensine durch Keratinozyten sezerniert werden (Cristiano, 2008) und dann im Stratum corneum zwischen den Hornzellen liegen.

Andere Autoren beschrieben, dass in der Epidermis hBD-1 im Stratum granulosum (Bøe et al., 1999), hBD-2 im Stratum granulosum und/oder im Stratum germinativum (Milner et al., 2002; Poindexter, 2005; Chadebech et al., 2003; Krisanaprakornkit et al., 2000) und hBD-3 in den Zellen des Stratum spinosum (Poindexter, 2005) nachgewiesen werden konnte, das nah an die verhornte Schicht des Stratum corneum angrenzt und somit die äußerste lebende Schicht der Epidermis darstellt. Das Stratum germinativum und das Stratum granulosum zeichnen sich durch eine Expression aller bisher in der Epidermis identifizierten β -Defensine aus.

Der Haarfollikel, ein Hautanhangsgebilde, besteht aus vielen epithelialen Schichten, die zum Teil in die Epidermis übergehen.

Unsere Hypothese war, dass β -Defensine, falls sie eine Rolle bei der Barrierefunktion der Haut spielen, kontinuierlich sein müssen, d. h. sowohl in der Epidermis als auch in den Hautanhangsgebilden (Haarfollikeln) vorhanden sein sollten.

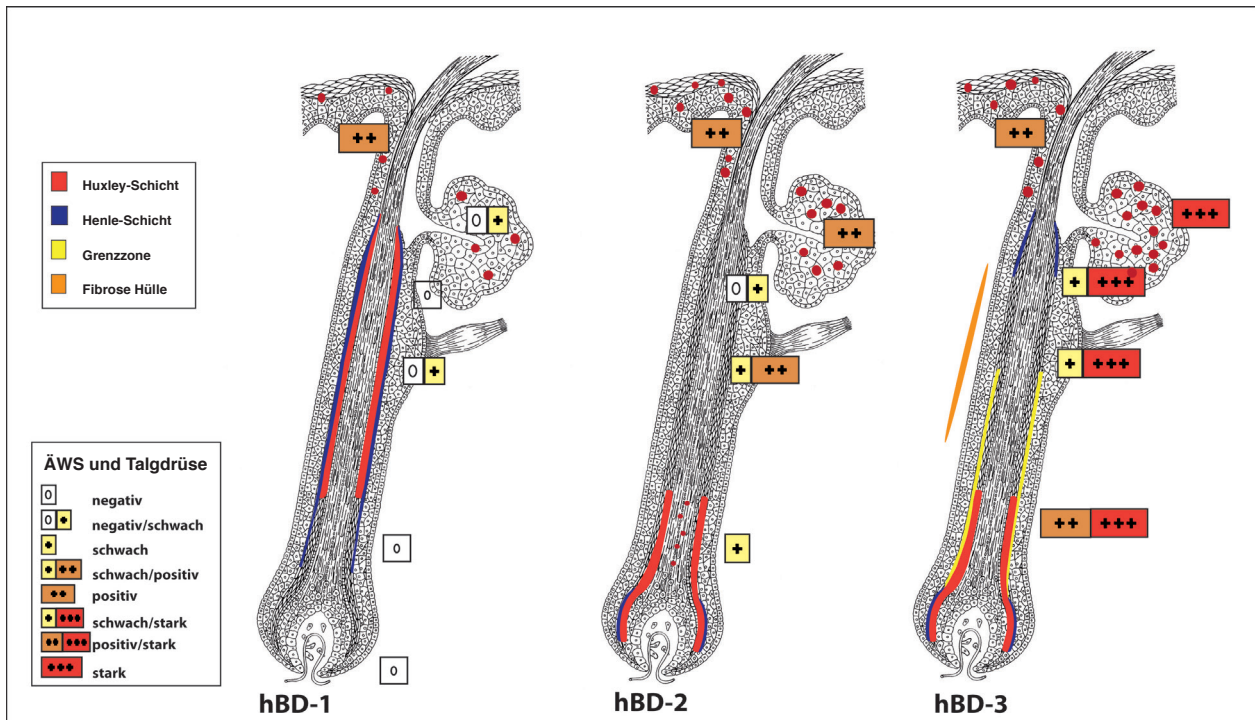


Abb. 36: Die Verteilung von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Terminalhaarfollikeln

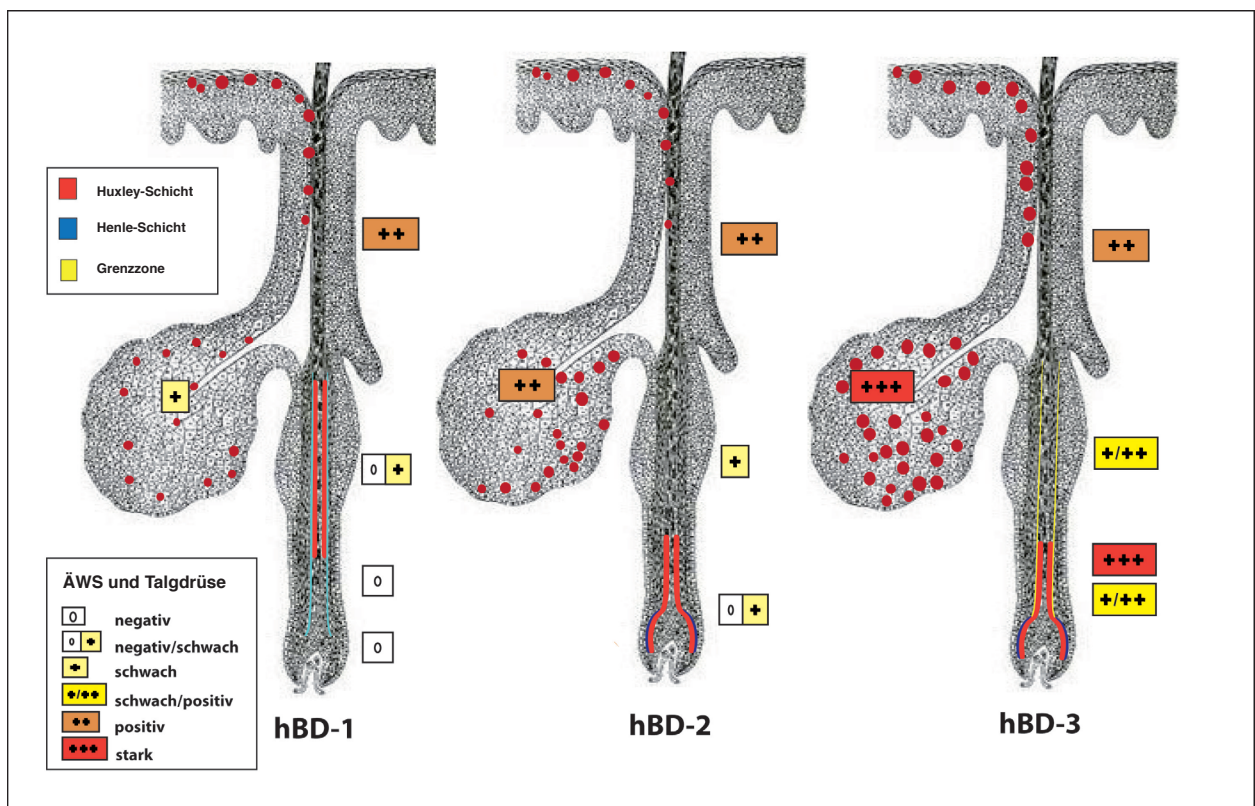


Abb. 37: Die Verteilung von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Vellushaarfollikeln

Umso bemerkenswerter ist es, dass hBD-1, hBD-2 und hBD-3 entsprechend der erwarteten, in den Abbildungen 36 und 37 beschriebenen Verteilung gefunden wurden, während hBD-3 gleichermaßen, teils sogar proximal zum Bulbus hin zunehmend exprimiert ist. Auch dies spricht dafür, dass hBD-3 eine besondere Rolle im Haarfollikel zukommt, die nicht nur antimikrobiell, sondern zugleich regulatorisch ist.

4.1.2 hBD-1, hBD-2 und hBD-3 als immunstimulatorische Moleküle im distalen Haarfollikel

hBD-1, hBD-2 und hBD-3 werden eher in den oberflächlichen Arealen des Haarfollikels exprimiert, da der Bereich um die Haarfollikeleingänge besonders anfällig für mikrobielle Invasionen ist (Abb. 38). Um häufigen Infektionen der Haut entgegenzuwirken, sind diese an der Hautoberfläche befindlichen Haarfollikelbereiche mit antimikrobiellen Verteidigungsmechanismen, wie z. B. β -Defensinen, ausgestattet. So konnten Antigen-präsentierende Zellen in besonders hohen Dichten im Haarbalg der Haut ermittelt werden (Thomas et al., 1984). Die Zellen konzentrieren sich insbesondere am oberen Teil des Haarfollikels und wurden nicht nur in der suprabasalen Schicht, sondern auch in der untersten Schicht der äußeren Wurzelscheide nachgewiesen. In der gleichen Region wurden hBD-1 und hBD-2 festgestellt (Philpott et al., 2003; Chronnell et al., 2001). hBD-2 und hBD-3 induzieren die Migration und Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen und wirken als Immunverstärker (Funderburg et al., 2007; Tewary et al., 2008; Morgera et al., 2011).

4.1.3 hBD-2 und hBD-3 als immunsuppressive Mediatoren im proximalen Haarfollikel

Diese Ergebnisse führten uns zu der Hypothese, dass insbesondere hBD-3 und hBD-2 nicht nur antimikrobielle Funktionen an der Hautoberfläche wahrnehmen, sondern möglicherweise auch regulatorische Funktionen im Haarwuchs. Es konnten molekulare Zusammenhänge von hBD-3 mit anderen immunregulatorischen Faktoren gefunden werden, die eine mögliche Rolle z. B. für das Aufrechterhalten des Immunprivilegs spielen und eine immunmodulatorische Beteiligung am Immunsystem aufweisen (Abb. 38).

Die immunmodulatorische Funktion der β -Defensine im proximalen Teil des Haarfollikels (d. h. im Bulbus- sowie Wulstbereich) betrifft, so die Annahme, einerseits die Immunsuppression, um das Immunprivileg zu schützen, andererseits die Pigmentation, bei der die jeweils lokalisierten Melanozyten reguliert werden (Tobin, 2011). In den wenigen Studien zur immunsuppressiven Wirkungsweise der β -Defensine wurden von Semple et al. (2010, 2011 und 2012) ausgeführt, dass das β -Defensin wahrscheinlich einen Rezeptor aktiviert und die Expression anti-inflammatorischer Mediatoren induziert. Außerdem zeigten Candille et al. (2007), dass eine hohe Bindungsaffinität des menschlichen Orthologs (hBD-3) zu MC1R besteht und dies eine einfache, aber starke Wirkung auf die Pigmentierung hat.

Es ist zu vermuten, dass andere Interaktionen möglicherweise fehlen und das Immunprivileg deshalb kollabiert, ausschlaggebend könnte hier ein Ungleichgewicht oder eine Fehlregulation des β -Defensin-Melanocortin sein. hBD-3 hemmt die TNF- α -Akkumulation, dies impliziert eine anti-inflammatorische Funktion, auch übt CD40/IFN- γ eine hemmende Wirkung aus (Semple et al., 2010). β -Defensine könnten eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen der Haarfollikel, wie Alopecia areata (AA) und Lichen planopilaris, spielen (Ab. 38). Die Entstehung von AA hängt von mehreren Faktoren ab, zudem müssen bestimmte Schwellenwerte überschritten werden, bevor es zu klinisch signifikanten Veränderungen kommt..

Sato-Kawamura et al. (2003) wiesen auf eine starke Expression von CD40 und HLA-DR-Antigen hin und Kasumagic-Halilovic et al. (2011) zeigten, dass TNF- α bei AA signifikant höhere Werte im Serumspiegel zeigt. Außerdem könnten ein anormal Corticotropin freisetzendes Hormon und die bei AA zu beobachtende Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse eine Autoimmunreaktion auslösen (Zhang et al., 2009).

In Lichen planopilaris findet sich das Entzündungsinfiltrat hauptsächlich um die Wulstregion, in der sich die Stammzellen befinden (Mobini et al., 2005). Möglicherweise übt hBD-3 eine entzündungshemmende Wirkung aus (Semple et al., 2010).

β -Defensin als Immunmodulator

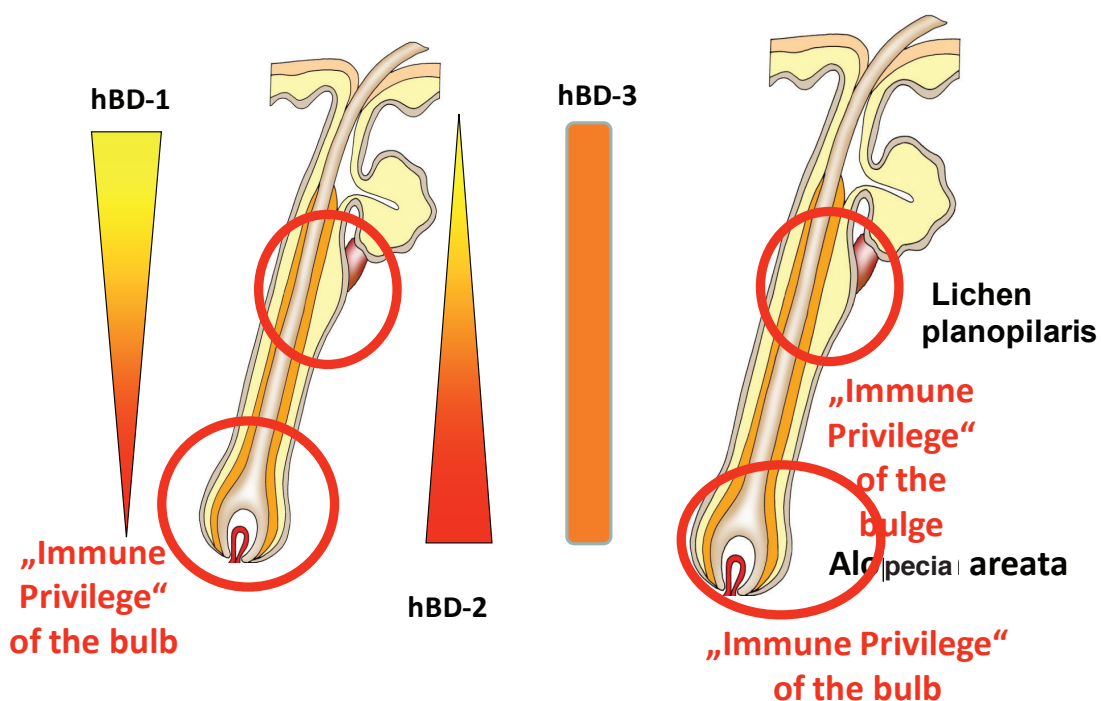


Abb. 38 β -Defensin als Immunmodulator (Vogt A, McElwee K, Blume-Peytavi U (2008) Biology of the hair follicle. In: Hair Growth and Disorders. Ed: Blume-Peytavi U, Tosti A, Whiting D, Trueb R, Springer, Germany) (modifizierte Abbildung)

4.2 β -Defensine als Immunmodulatoren

In den letzten zehn Jahren wurden, zusätzlich zu den direkten mikrobiziden Wirkungen, mehrere immunmodulatorische Funktionen der β -Defensine erkannt, so sind sie chemotaktisch aktiv, sie fördern die Antigenpräsentation und modulieren die proinflammatorische Zytokinsekretion (Tab. 40). Diese Befunde lassen vermuten, dass β -Defensine nicht nur eine Schutzfunktion gegenüber schädlichen Außeneinwirkungen wahrnehmen, sondern auch als Bindeglied zwischen angeborenen und adaptiven Immunantworten agieren (Niyonsaba et al., 2006; Bowdish et al., 2006; Niyonsaba et al., 2009; Yang et al., 1999). Außerdem sind sie an der Regulierung von Entzündungsvorgängen beteiligt, sie beschleunigen die Angiogenese, fördern die Wundheilung und Reepithelisierung und spielen eine Rolle bei der Neutralisation von Lipopolysacchariden.

Tab. 40: Immunmodulatorische Funktionen von humanen β -Defensinen

Ziel	Immunmodulatorische Wirkung	Defensine	Ref.
Mo	Chemotaxis	hBD1-4	Garcia et al. (2001b)
MΦ	Hemmung von TNF α , IL8, IL6, IL1 β und NO-Freisetzung	hBD3	Semple et al. (2010)
	Chemotaxis	hBD1-4	Soruri et al. (2007) Röhrl et al. (2010)
iDC	Reifung (Hochregulation von CD40, CD80, CD86, MHC II)	hBD3	Yang et al. (2007) Biragyn et al. (2001) Funderburg et al. (2007)
	Chemotaxis	hBD2-3	Biragyn et al. (2001) Yan et al. (1999) Röhrl et al. (2010)
Granulozyten	Chemotaktisch für TNF α -aktivierte Zellen	hBD2	Niyonsaba et al. (2004)
	Hemmung der Apoptose	hBD3	Nagaoka et al. (2008)
Mastzellen	Erhöhung der Mastzellendegranulation	hBD2	Chen et al. (2007) Niyonsaba et al. (2002)
	Chemotaxis	hBD1-4	Soruri et al. (2007) Niyonsaba et al. (2002)
T-Zellen	Steigerung von IFN γ , TNF α , IL10, IL1 β , IL6 und IL22, Hemmung der IL17-Sekretion	hBD2	Lillard et al. (1999) Kanda et al. (2011)
Endothelzellen	Stimulation der Angiogeneese	hBD2	Baroni et al. (2009)
Keratinocyten	Erhöhung der IL1 β , IL6, IL10, IP10, MCP1, MIP3 α , RANTES, IL18	hBD2-4	Niyonsaba et al. (2004) Niyonsaba et al. (2005) Niyonsaba et al. (2007)
	Erhöhung der Migration und Proliferation	hBD2-4	Niyonsaba et al. (2004)

Legende: Monozyten (Mo), Makrophagen (M Φ), Tumornekrosefaktor α (TNF), unreife dendritische Zellen (iDC), Interleukin (IL), Interferon (IFN), Cluster der Differenzierung (CD), Major Histocompatibility Complex (MHC), Monozyten-chemotaktisches Protein (MCP), Macrophage Inflammatory Protein (MIP), bei Aktivierung geregeltes, normale T-Zelle exprimierendes und vermutlich sekretiertes Protein (RANTES).

4.2.1 β -Defensine und die Beeinflussung der Pigmentierung

Ein unerwartetes als auch faszinierendes Beispiel für die unterschiedliche Bindung der β -Defensine wurde *in vivo* in den Farbgenen von Hundehaaren entdeckt (Candille et al., 2007). Die Bindung eines β -Defensins an Melanocortin-Rezeptoren ist insofern interessant, als diese Rezeptoren eine Vielzahl von Signalprozessen einschließlich der Pigmentierung auslösen (Semple et al., 2012).

Meine vorliegenden Forschungsergebnisse bestätigen eine starke Expression von hBD-2 und hBD-3 in der Bulbus- und Wulstregion, in denen sich lt. Narisawa et al. (1997), Commo und Bernard (2000) und Nishimura (2011) Melanozyten befinden. Untersuchungen von Candille et al. (2007) ergaben, dass bereits nanomolare Mengen von β -Defensinen als hochaffine Liganden des Melanocortin-1-Rezeptors (MC1R) in primären humanen Melanozyten Pigmentierungseffekte bewirken. Es gilt in der Literatur als allgemein anerkannt, dass MC1R eine zentrale Rolle bei der Pigmentierung sowie bei der Melanomanfälligkeit des Menschen spielt. Es wird angenommen, dass hBD-3 eine wichtige Funktion in der Biologie der Melanozyten ausübt, dass es an der Reaktion der menschlichen Haut auf UV-Strahlung beteiligt ist sowie die Anfälligkeit für Hautkrebs beeinflusst (Swope et al., 2012; Abdel-Malek und Supp, 2008). Dennoch hat hBD-2 keinen Einfluss auf das Produktionsniveau der Melanin-Zellen (Gerashchenko et al., 2014).

4.2.2 hBD-3 und ihre Wirksamkeit bei Melanocortinrezeptoren

Pharmakologische und genetische Studien haben gezeigt, dass hBD-3 als neutraler Melanocortin-Rezeptor-Antagonist agiert, der die Wirkung stimulierender Agonisten, wie die des α -Melanozyten-stimulierenden Hormons, oder hemmender inverser Agonisten, wie die des Agouti-Signalproteins (Asip) und des Agouti-verwandten Proteins (AgRP), blockieren kann (Nix et al., 2013; Swope et al., 2012).

Nix et al. (2013) postulieren, dass sich die Art und Weise, in der β -Defensine Melanocortinrezeptoren binden, grundsätzlich von der Bindung „klassischer“ Melanocortin-Liganden (wie beispielsweise α -MSH, Asip oder AgRP) unterscheidet und auf örtlich begrenzten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Patches auf der Oberfläche des Liganden mit negativ geladenen Bereichen auf der Oberfläche des Rezeptors beruht. Alles deutet darauf hin, dass hBD-3 nicht die relative Balance zwischen aktiven und inaktiven Konformationen beeinflusst, jedoch bewirkt, dass der Bindungseinschluss des Melanocortins weniger zugänglich für stimulierende oder hemmende Liganden ist.

Zudem hielten Nix et al. (2013) dies für eine mögliche Erklärung für den scheinbaren Widerspruch der Befunde von Candille et al. (2007), nach denen hBD-3 ein Peptid mit Melanocortin-Agonist-ähnlichen Effekten ist, und den Ergebnissen von Swopes et al. (2012), die hBD-3 als einen α -MSH-Antagonisten identifizieren.

Andererseits zeigte eine Untersuchung von Slominski et al. (2005), dass *in vivo* (bei Hunden oder

transgenen Mäuse) von POMC abgeleitete Melanocortin-Peptide keine nachweisbare Wirkung auf die Pigmentierung haben. Die Wirkungen des hBD-3 könnten vielmehr durch eine Hemmung der Asip verursacht werden.

Dennoch berichten Swope et al. (2012), dass hBD-3 die Wirkung exogener α -MSH, die kultivierten Melanozyten beigegeben wurde, blockieren kann. Folglich hängt das funktionelle Ergebnis einer hBD3-MCR-Wechselwirkung hinsichtlich einer Förderung bzw. Hemmung der Signalisierung vom spezifischen Kontext und vom relativen physiologischen Gleichgewicht zwischen Agonisten und inversen Agonisten ab.

Viele Forschergruppen betonen seit langem nachdrücklich die Möglichkeit eines Überlappungseffektes zwischen dem angeborenen Immunsystem und der Melanocortin-Signalisierung (Luger et al., 2003; Catania et al., 2004; Tatro et al., 2003). Es scheint möglich, dass die Defensin-vermittelte Modulation des Melanocortin-Rezeptor-Signals charakteristische phänotypische Merkmale des Immunsystems, des endokrinen Systems bzw. beider Systeme hervorrufen kann (Kaelin et al., 2008).

4.2.3 β -Defensine als Immunsuppressoren

Die immunregulatorische Funktion der β -Defensine wird durch das Mikromilieu und einen Stimulus ausgelöst, der auf die das Peptid exprimierende Zelle wirkt. Mehrere Studien belegen eine pro- als auch anti-inflammatorische Funktion einiger antimikrobieller Peptide. Diese Peptide, darunter hBD-2 und Cathelicidin LL-37, können die Freisetzung von proinflammatorischen (IL-6, IL-18) und entzündungshemmenden (IL-10) Zytokinen sowie Chemokinen von Epithelzellen fördern, wie in mehreren Untersuchungen *in vitro* gezeigt wurde (Niyonsaba et al., 2005 und 2007).

Semple et al. (2012) führen aus, dass der Mechanismus, nach dem die β -Defensine eine proinflammatorische Reaktion neutralisieren, nicht vollständig bekannt ist, mehrere mögliche Mechanismen wurden jedoch bereits untersucht. Ein möglicher Mechanismus ist die Bindung von hoch positiv geladenen Defensinen an negativ geladene Liganden (z. B. LPS), hierdurch wird gleichzeitig die Bindung von Ligand und Rezeptor beeinträchtigt. Darüber hinaus könnten Defensine als Antagonisten für Rezeptoren wirken, die proinflammatorischen Stimuli ausgesetzt sind. Rezeptoren und/oder Zellmembrane können durch Defensine gestört oder verändert werden, vergleichbare Reaktionen konnten bei antimikrobiellem LL-37 festgestellt werden, das ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung aufzeigt (Di Nardo et al., 2007; Mookherjee et al., 2006).

Ein weiterer Mechanismus in der Wirkungsweise der β -Defensine könnte auf unterschiedlichen Konzentrationen beruhen, wie hBD-3 z. B. in nanomolarer Konzentration über die Interaktion mit CCR2 eine Chemotaxis auslöst (Jin et al., 2010; Rohrl et al., 2010) sowie in höheren Konzentrationen eine antimikrobielle Aktivität (Garcia et al., 2001b; Harder et al., 2001; Wu et al., 2003) entwickelt.

Dennoch zeigten Semple et al. (2010), dass die entzündungshemmenden Eigenschaften von hBD-3 nicht durch MC1R oder MC3R vermittelt werden.

4.3 β -Defensine im Haarfollikel

4.3.1 β -Defensine in der distalen ÄWS

Wir fanden eine starke Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Stratum granulosum des Infundibulum, den Haarkanal umgebend, in den beiden Zellschichten der Isthmusregion und der distalen ÄWS sowie im pilosebazeösen Gang des Haarfollikels. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Chronnell et al. (2001) auch hinsichtlich hBD-1 und hBD-2.

Diese Befunde stimmen mit dem Konzept überein, dass diese Bereiche in hohem Maße Mikrobeninvasionen sowie der physiologischen Hautmikroflora ausgesetzt sind.

β -Defensine werden möglicherweise gerade dort – an der Körpergrenze – als Träger einer wichtigen Schutz- und Barrierefunktion verstärkt exprimiert.

β -Defensine leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion dieser Schichten. hBD-3 verbessert die Funktion der engen epithelialen Kontaktbarriere in humanen Keratinozyten (Kiatsurayanon et al., 2014). Zudem haben sich Hinweise gemehrt (Bos et al., 2001; Philpott et al., 2003; Lee et al., 2006), dass β -Defensine in der interfollikulären Epidermis eine wichtige Rolle für die Schutzfunktion spielen. Deshalb ist zu vermuten, dass β -Defensine auch im Haarfollikel in diese Funktion involviert sind. Dort könnten sie an der Selektion, welche natürlichen Antibiotika- β -Defensine durch die Schichten des Haarfollikels in den Körper eintreten, beteiligt sein.

In der Isthmusregion, einem Bereich, in dem die Zellen der Henle- und Huxley-Schichten bereits abgestorben sind, findet man eine Synthese von hBD-2 in der inneren Zellschicht, ebenso in den basalen Zellschichten der ÄWS. Die Intensität der Expression von hBD-3 ist in diesen Schichten ebenfalls gesteigert.

Dieses Expressionsmuster erinnert an die gesteigerte Synthese von hBD-2 bei Hautveränderungen, die mit einer gestörten Barrierefunktion des Stratum corneum einhergehen, z. B. bei Psoriasis (Harder et al., 1997; Huh et al., 2002; Hollox et al., 2008), Akne (Chronnell et al., 2001) und chronischen Wunden (Butmarc et al., 2004). Auch bei verbrannter Haut (Milner et al., 2002), die ebenfalls über keine ausgeprägte Barriere durch ein verhorntes Epithel verfügt, wird eine erhöhte β -Defensin-Expression beobachtet.

Die starke Expression von β -Defensinen im distalen Teil der äußeren Wurzelscheide des Terminalhaarfollikels und im Vellushaarfollikel insbesondere im Infundibulum bestätigt die Tatsache, wie Mathews et al. (1999) beschrieben, dass die konstitutive Expression des humanen hBD-1 eine Grundabwehr gegenüber pathogenen Mikroorganismen ermöglicht, ohne dass Entzündungszeichen in Erscheinung treten.

Talgdrüse

Bei der Anfärbung der gesamten Talgdrüsen mit β -Defensinen im Vellushaar-, Intermediärhaar- und Terminalhaarfollikelapparat war deren Verteilung insbesondere in Zellen des Ductus und den

inneren Interzellen gleich. Lediglich die Intensität für hBD-1, hBD-2 und hBD-3 war verschieden. Dabei zeigte hBD-3 ein Maximum in den basalen, undifferenzierten Zellen und in den inneren differenzierten Zellen. Im gleichen Bereich wurde hBD-2 positiv und hBD-1 negativ oder schwach exprimiert. Chronnell et al. (2001) haben eine markante hBD-1- und hBD-2-Immunreaktivität in der Talgdrüse gefunden. hBD-1 war in Talgdrüsen von normaler menschlicher Haut (Ali et al., 2001) und meataler Haut (Bøe et al., 1999) vorhanden.

hBD-2 und Cathelicidin wurden in kultivierten menschlichen Sebozyten nachgewiesen. Die meisten dieser Zellen befinden sich in den Talgdrüsen und ihre Expression ist bei Anwesenheit von *Propionibacteria acnes* hoch reguliert (Nagy et al., 2006; Lee et al., 2008). Nagy et al. (2005) beschrieben, dass *P. acnes* eine selektive hBD-2- und Interleukin-8-Expression in humanen Keratinozyten durch Toll-like-Rezeptoren induzieren. Andererseits übt die Kombination von hBD-2 und Laurinsäure, einer Fettsäure, in subletaler Dosierung eine synergistische antimikrobielle Aktivität gegen *P. acnes* aus. *P. acnes* besiedeln vorrangig den Hauttalg des Haarfollikels, daraus folgt, dass das Mikroambiente menschlicher Haarfollikel antimikrobielle Komponenten aus Sebozyten sezerniert und deren antimikrobielle Aktivität synergistisch durch Induktion einer hBD-2-Expression anregen kann. Hierbei erhöhen die freien Fettsäuren die desinfizierende Aktivität der menschlichen Talgdrüsen und lösen dadurch eine starke antimikrobielle Abwehr der Haut gegenüber einer Besiedlung und Infektion durch Krankheitserreger aus (Nakatsuji et al., 2010).

Zahlreiche Untersuchungen an Hautschnitten konnten belegen, dass sich der Großteil der resistenten Hautbakterien in den Haarfollikeln und in den assoziierten Talgdrüsen findet (Lovell, 1945; Montes, 1970; Selwyn, 1972; Fritsch, 2004; Hadaway, 2003). So wird vermutet, dass die Bakterien der residenten Hautflora ihr Reservoir in Haarfollikeln oder Talgdrüsen haben (Brown et al., 1989; Hendley, 1991). Hier können sie Ausgangspunkt für Infektionen des Haarfollikels, Haarbalg entzündungen und auch Haarkrankheiten (z. B. Akne, Follikulitis) sein. Aus diesem Grund wird im Haarfollikel ein effektives Abwehrsystem in Form von β -Defensinen benötigt.

4.3.2 β -Defensine in der zentralen ÄWS und in der Wulstregion

In der vorliegenden Untersuchung konnten markierte hBD-2- und hBD-3-Expressionen in der zentralen ÄWS und in der Wulstregion des Haarfollikels in den basalen Keratinozyten nachgewiesen werden. In diesem Bereich stieg die Positivität der drei β -Defensine von den inneren bis zu den basalen Zellen der ÄWS mit unterschiedlicher Intensität, wobei hBD-3 stark, hBD-2 positiv und hBD-1 schwach oder in einigen Fällen nicht vorhanden war. Hingegen fanden Chronnell et al. (2001) ähnliche Ergebnisse mit hBD-2, jedoch nicht mit hBD-1, das eine intensive Färbung in den basalen Zellen zeigte.

Möglicherweise war eine unserer auffälligsten Beobachtungen, dass sich, im Gegensatz zu dem Haarkanal, dem pilosebazeösen Gang und interfollikulären Epithel (Chronnell et al., 2001; Ali et al., 2001), die β -Defensin-Expression auf die suprabasalen Schichten beschränkte.

Der Grund für diesen regionalen Unterschied ist nicht eindeutig. Jedoch wird allgemein

angenommen, dass die zentrale ÄWS und der Wulst des Haarfollikels eine Epidermalpopulation von Stammzellen enthalten (Cotsarelis et al., 1990, 1999; Sun et al., 1991; Rochat et al., 1994). Es bietet sich folglich an, darüber zu spekulieren, ob es die Rolle von β -Defensinen in dieser Region der ÄWS sein kann, das Stammzellkompartiment vor einer Mikrobeninvasion zu schützen. Roh et al. (2005) haben bestätigt, dass der menschliche HF-Wulstbereich Keratinozyten-Stammzellen enthält, während die Haarmatrix eine Proliferation und vorübergehend eine verstärkte Differenzierung von Kompartimentzellen aufweist.

Eine ähnliche Rolle der Defensine im Darm ist bereits von Ganz (1999) diskutiert worden. Er berichtete über eine markante Defensin-Expression in den Paneth-Zellen des Dünndarms.

Da Paneth-Zellen in den Darmkrypten lokalisiert sind, wird vermutet, dass Paneth-Zellen-Sekrete Stammzellen vor pathogenen Mikroben schützen könnten. Ob β -Defensine eine wichtige Rolle beim Schutz von Stammzellen im Haarfollikel spielen, sollte weiter erforscht werden.

4.3.3 β -Defensine in der proximalen ÄWS

Ein interessanter Befund hinsichtlich der β -Defensine zeigte sich in den Follikelapparaten: Während sich die maximalen Expressionsmuster von hBD-3 in der ÄWS im proximalen Follikel finden, lassen sich im Gegensatz dazu hBD-1 und hBD-2 vorwiegend im distalen Follikel (ähnliche Ergebnisse bei Chronnell et al., 2001) nachweisen. Dieses Verhalten der unterschiedlichen Expressionsmuster der β -Defensine könnte auf eine immunmodulatorische Funktion hindeuten.

Die Positivität von hBD-3 in der ÄWS steigerte sich ab dem unteren bis in das obere Drittel des Suprabulbärbereiches (THF und VHF), wobei die Betonung von hBD-3 in den basalen Zellen der ÄWS der Terminalhaarfollikel lag. In diesem Bereich wurde, im Gegensatz zu früheren Studien, ein Maximum der Intensität nachgewiesen. Die Erläuterung der Bedeutung dieses Befundes für physiologische und pathologische Prozesse im Haar muss noch offenbleiben. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Expressionsmuster von hBD-3 eine wesentliche Form der Regulierung der Zytokine darstellen.

4.3.4 β -Defensine in der IWS und im Bulbus

In der vorliegenden Untersuchung wurden die drei β -Defensine maximal in der inneren Wurzelscheide aller Haartypen exprimiert, jedoch mit unterschiedlichen Verteilungen. hBD-2 und hBD-3 wiesen eine markierte Expression im proximalen HF auf, während für hBD-1 eine verstärkte Immunreaktion in der gesamten IWS dargestellt werden konnte.

hBD-1 zeigte in dieser Untersuchung ein Expressionsmuster, das bei beiden Haarfollikeltypen etwas variierte. Im Terminalhaar- und Vellushaarfollikel zeigte sich in den besser entwickelten Anagenstadien in allen Fällen ein Maximum der Expression in beiden Anteilen der inneren Wurzelscheide ab Isthmus, in der Wulstregion bis in das obere und mittlere Drittel des Suprabulbärbereiches. Im unteren Drittel des Suprabulbärbereiches zeigte sich eine Expression von hBD-1 bei allen drei Haartypen nur in der Henle-Schicht.

Ähnliche interessante Beobachtungen wurden von Chronnell et al. (2001) in einer Untersuchung an Haarfollikeln der Gesichtshaut mit hBD-1 beschrieben. Dabei wurde eine starke Überregulation von hBD-1 in der proximalen IWS eines kleinen pilosebazeösen Follikels neben einem Komedo beobachtet. Die funktionelle Bedeutung dieses Sachverhalts ist nicht eindeutig.

Interessant ist, dass wir eine intensive Immunreaktivität für hBD-2 und eine moderate hBD-3-Reaktion in der inneren Wurzelscheide (Huxley-Schichten), sowohl im unteren als auch im mittleren Drittel des Suprabulbärbereiches und des Bulbus, beobachtet haben. Außerdem wurde die Positivität im Bulbus in beiden Schichten der IWS (THF) nachgewiesen. Hier war die Expression am intensivsten. Dies zeigte sich (in acht Fällen) in der dermalen Papille im Haarbulbusbereich. Ähnliche Ergebnisse wurden von Chronnell et al. bereits 2001 berichtet, wobei hBD-2 stark zunahm und in dem gesamten proximalen periläsionalen Follikel (Akne) einschließlich der mesenchymal abgeleiteten DP nachgewiesen werden konnte. Milner et al. (2002) haben mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie hBD-2 im Haarbulbus von normaler und verbrannter Haut gefunden. Der Haarbulbus umschloss fast vollständig die mesenchymale DP (Paus et al., 1994d).

Außerdem wurde hBD-3 in Isthmus und Wulst nur in der Henle-Schicht der inneren Wurzelscheide festgestellt, andere Studien beschrieben keine β -Defensin-Expression in dieser Lokalisation.

Die Rolle von hBD-2 und hBD-3 in der inneren Wurzelscheide des proximalen Follikels und des Bulbus ist noch nicht vollständig geklärt. Der genaue Mechanismus für die Selektivität der Expression von hBD-2 und hBD-3 in der proximalen IWS des Haarfollikels ist bisher allerdings noch nicht identifiziert worden. Es handelt sich hier möglicherweise um eine Immunmodulation der β -Defensine.

Dennoch (Poindexter, 2005) kann berichtet werden, dass hBD-2 in der Tiefe der Dermalzellen verbrannter Haut lokalisiert wurde. Diese Tatsache veranlasst uns zur Hypothese, dass ekkrine Drüsenepithel oder Haarwurzeln und der Haarbulbus mit assoziierten Melanozyten „potenzielle Fabriken“ für die antimikrobielle Produktion sein könnten. Wie bekannt ist, stellt der Haarbulbus die Proliferationszone der Haarmatrix dar. Die epitheliale Haarmatrix bildet die stoffwechselaktivste Zone mit hoher mitotischer Zellteilungsrate im wachsenden Follikel (Anagenphase) (Serri und Cerimele, 1990). Die dermale Papille selbst nimmt eine zentrale Position in der Steuerung von Prozessen, wie zelluläre Adhäsion und Ausbreitung, Migration, Zellproliferation, Regulation der Genexpression und Wachstumsfaktor-Aktivität, ein (Blume-Peytavi, 1996).

Aufgrund der Bedeutung dieses Bereichs werden β -Defensine als Schutz vor Infektionen sowie andere immunmodulatorische Funktionen von humanen β -Defensinen angenommen und sollten weiter erforscht werden.

4.3.5 Besonderheit der β -Defensine

β -Defensine an der Grenze zwischen äußerer und innerer Wurzelscheide

Ein interessanter Befund zeigte sich in den Follikelapparaten für das hBD-3. Eine deutliche

Expression wurde ebenfalls an der Grenze zwischen der ÄWS und IWS der inneren Zellschicht der ÄWS und der Henle-Schicht der IWS – ab der suprabulbären Region bis zum Isthmus – festgestellt.

Die Positivität der Grenzzone bei THF, IHF und VHF war nur in acht Fällen gegeben.

Die innere Zellschicht der ÄWS ist eine Schicht, die sich durch besondere Eigenschaften von den angrenzenden Zellen der ÄWS unterscheidet (Orwin, 1971; Ito, 1986). Miyauchi und Mitarbeiter (1990) haben in der inneren Zellschicht im Vergleich zur restlichen ÄWS eine starke Proliferationszone ausgemacht.

Einerseits wird der innersten Zellschicht eine große Bedeutung bei der Keratinisierung der Henle-Schicht beigemessen. Andererseits besteht die Hypothese, dass diese Zellen in einem hohen Maße für die β -Defensin-Produktion von Bedeutung sind.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, weiter zu erforschen, wie β -Defensine bzw. deren komplexes Verbindungssystem zwischen ÄWS und IWS wirken und welche Auswirkungen sie auf den gesamten Haarfollikel haben könnten. Dieses komplexe Verbindungssystem in Haarfollikeln könnte eine wichtige Funktion erfüllen, indem es der Haut, die im täglichen Leben mechanisch beansprucht und durch hBD-3 geschützt wird, zusätzliche architektonische Stabilität verleiht.

Medulla

Interessante auffällige Befunde ergaben sich am Terminalhaarfollikel bei gezielter Untersuchung mit einem polyklonalen Antikörper gegen hBD-2 und hBD-1 zur Darstellung positiver Medulla. hBD-2 war deutlich positiv in vier Fällen und hBD-1 schwach positiv in nur einem Fall. Bei hBD-2 konnte eine verstärkte Immunreaktivität in der Medulla im gesamten suprabulbären Bereich in Form eines Pünktchenmusters beobachtet werden.

Einer der wichtigsten Bestandteile des Haares ist der Markstrang (Medulla). In ihm zirkulieren Mineral- und Spurenelemente oder auch ein Übermaß an toxischen Elementen, die im Organismus vorliegen. Außerdem dient die Medulla als Pigmentreservoir, um die wärmeisolierenden Eigenschaften der Haare zu verbessern.

Aufgrund der Bedeutung dieses Bereichs werden β -Defensine als Schutz vor Infektionen exprimiert.

Fibröse Hülle – umgebende Gewebescheide

Eine weitere Besonderheit ist die fibröse Hülle des Haarfollikels im Bereich des Wulstes und der suprabulbären Region der ÄWS (oberes Drittel). Sie weist im THF eine eigenständige Differenzierung auf, wobei eine selektive, intensive Anfärbung mit anti-hBD-3 in diesen Bereich gezeigt werden konnte.

Jahoda und Reynolds (2001) beschrieben, dass die fibröse Hülle ein Ort möglicher Progenitorzellen sein könnte, darüber hinaus zeigten Lako et al. (2002), dass mesenchymale Zellen der fibrösen Hülle und der dermalen Papille in vitro und in vivo zur Bildung hämatopoetischer Zelllinien fähig sind.

Außerdem können die Bindegewebszellen am unteren Pol der Bindegewebsseide sämtliche relevanten, aus der Dermis entstehenden Strukturen der Haarfollikeleinheit erneuern (Übersichtsartikel: Hoffman und McElwee, 2003). Wahrscheinlich produzieren oder synthetisieren diese Bindegewebszellen hBD-3. Die positive Reaktion „fibröse Hülle“ im THF spricht für die erläuterte hBD-3-Interaktion zwischen HF und umgebendem Gewebe. In Hinblick darauf, dass ein neuer proximaler Follikel aus der angrenzenden Bindegewebsseide regeneriert wird (Oliver, 1966), könnte hBD-3 anwesend sein. Besonders interessant ist die Interaktion. Sie besitzt eine wichtige Funktion für den physiologischen Schutzmechanismus, z. B. zur Vermeidung von Infektionen wie der Follikulitis (Entzündung der bindegewebigen Haarwurzelseide). Wahrscheinlich spielt hBD-3 auch eine wichtige Rolle beim Schutz vor möglichen Progenitorzellen in diesem Bereich.

4.3.6 β -Defensine im Vergleich distaler und proximaler Haarfollikel

hBD-1, hBD-2 und hBD-3

In Rahmen der Untersuchungen konnten wir interessante Beobachtungen feststellen. Es gibt deutliche Unterschiede zwischen der hBD-1-, hBD-2- und hBD-3-Expression in gesunden Hautproben.

In unseren Untersuchungen fanden wir starke konstitutive Expressionsmuster aller drei β -Defensine im distalen ÄWS um den Haarkanal herum und im pilosebazeösen Gang des Haarfollikels. In diesen Bereichen kann von einer hohen immunologischen Aktivität ausgegangen werden.

Diese Ergebnisse entsprechen dem Konzept, dass diese Regionen in hohem Maße einer Mikrobeninvasion sowie der physiologischen Hautmikroflora ausgesetzt sind. Demgegenüber zeigen Haarfollikelabschnitte sowie die proximale ÄWS, die IWS und der Haarbulbus selten eine Mikrobeninvasion. hBD-1 war hier mit Ausnahme der IWS negativ. Unerwartet ist die Expression von hBD-2 und hBD-3 (siehe unter „hBD-2 und hBD-3“).

Die Befunde stehen jedoch im Widerspruch zu den Angaben in der bisherigen Literatur. Chronnell et al. (2001) beschrieben nur sehr schwache Expressionen von hBD-1 und hBD-2 im gleichen Bereich. hBD-2 war am häufigsten in den Haarfollikeln (schwach bis mäßig) exprimiert und hinsichtlich hBD-3 war der Nachweis am Haarfollikel negativ (Bürkle, 2011).

Es ist wichtig zu beachten, dass der proximale Follikel während des normalen Haarzyklus nur temporär erscheint. Für diesen zyklischen Wechsel spielt die Apoptose eine wesentliche Rolle (Stenn et al., 1998; Cotsarelis et al., 1999; Paus et al., 1999; Paus und Cotsarelis, 1999). Außerdem ist bekannt, dass der Follikel in der Lage ist, einen neuen proximalen Follikel aus der distalen ÄWS und der angrenzenden Bindegewebsseide zu regenerieren, wenn der proximale Follikelbulbus vollständig zerstört ist (Oliver, 1966; Paus et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist der distale Follikel permanent und nicht einer apoptotisch getriebenen Regression (Lindener et al., 1997) unterlegen. Deshalb kann eine mikrobielle Invasion in dieser Region des Haarfollikels zur vollständigen Zerstörung des Follikels führen.

Insbesondere die ausgeprägte Nachweisbarkeit in der Bulbusregion, welche gerade bei den Terminalhaaren in der Tiefe der Haut liegt, weist darauf hin, dass diesen Molekülen nicht nur eine antimikrobielle, sondern auch eine regulatorische Funktion zukommt.

hBD-2 und hBD-3

Obwohl die proximale ÄWS, die IWS (Follikel) sowie der Haarfollikelbulbus selten einer Mikrobeninvasion ausgesetzt sind, haben wir eine starke Expression von hBD-2 und eine gemäßigte hBD-3-Reaktion in diesen Haarfollikelabschnitten beobachtet. Die Expression dieser β -Defensine zeigte eine signifikant hohe Intensität. In dem gesamten proximalen Follikel einschließlich der mesenchymal abgeleiteten DP ist diese stark ausgeprägt, während eine gemäßigte Expression von hBD-1 nur auf die Henle-Schicht der IWS beschränkt ist.

In einer Untersuchung aus 2001 konnten Ähnlichkeiten im Musterausdruck von hBD-1 und hBD-2 gezeigt werden (Chronnell et al., 2001). Zudem gab diese Studie eine β -Defensin-Expression in den periläsionalen Follikeln (Akne) an. Dies deutet darauf hin, dass inflammatorische Zytokine fähig sein könnten, die β -Defensin-Expression sowohl in den distalen als auch in den proximalen Follikeln überzuregulieren. Dies basiert nur auf einem Bulbus von pilosebazeösen Einheitsläsionen. Zytokine wirken bekanntermaßen immunmodulierend (pro- oder anti-inflammatorisch) und dienen der Kommunikation der Abwehrzellen untereinander (Roitt, 1998; Cohen, 1996).

hBD-2 und hBD-3 ließen sich in gesunder Haut kaum nachweisen, wohingegen entzündliche Vorgänge oder der Kontakt mit bestimmten Bakterien die β -Defensin-Produktion induzierten (Harder et al., 2001). Jedoch haben wir eine deutlich verstärkte Intensität beider β -Defensine in gesunden Haarfollikeln beobachtet. Aus diesen vorläufigen Ergebnissen ergibt sich die Frage, ob eine Regulation der Expression von β -Defensinen auch in nicht entzündlichen Haarfollikeln durch Zytokine stattfindet.

Diese Beobachtungen könnten für eine Schlüsselrolle der β -Defensine, unmittelbar an den potenziell epithelialen Infektionsarealen, zum Schutz der Haarfollikel vor mikrobieller Infektion sprechen (Körper et al., 2005).

4.4 β -Defensine in THF vs VHF

Abschließend müssen wir betonen, dass es wenige Unterschiede im Expressionsmuster der β -Defensine bei den in dieser Studie untersuchten normalen Hautbiopsien des Kopfes und beim Facelift gibt. Dabei bemerkten wir wesentliche Variationen in der Intensität von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 je nach Geschlecht und Alter der Patienten, in Abhängigkeit von der Lokalisation (Gesichtshaut und Kopfhaut) sowie zwischen den unterschiedlichen Haarfollikelarten (Terminalhaar-, Intermediar- und Vellushaarfollikel).

Obwohl durch das andere Größenverhältnis Follikel zu Talgdrüse erwartet werden kann, dass sich das biochemische Milieu zwischen VHF und THF unterscheidet (Vogt et al., 2007), wurden für die β -Defensin-Subtypen gleichartige Expressionsmuster gefunden.

Die untersuchten Haarfollikel stammten sämtlich von der gleichen Körperregion. Umfassende Untersuchungen zum Mikrobiom der Haut haben mittlerweile deutliche Unterschiede an den verschiedenen Körperarealen identifiziert. Es wäre also durchaus denkbar, dass sich je nach Besiedlungszustand auch andere Expressionsmuster von β -Defensinen finden ließen. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Eine neue Forschungsstudie wäre von großer Bedeutung, um z. B. an anderen Körperstellen die Korrelation von Bakterienbesiedlung und inflammatorischen Markern (β -Defensine assoziieren mit anderen Cytokinen, Chemokinen) zu untersuchen. Hierzu wären In-vivo-Untersuchungen an gesunden Patienten und bei Patienten mit entzündlichen Hauterkrankungen hochrelevant, nicht invasive Sammelmethode, z. B. mit Hilfe von Tape-Strippings, könnten helfen, multiple Proben eines selben Probanden zu untersuchen und die Defensine zu quantifizieren.

Die deutliche Expression von hBD-3 auch in tiefen/proximalen Abschnitten der Haarfollikel weist auf eine weitergehende Bedeutung hinsichtlich Haarwuchs und Zyklusregulation hin, so dass diese Marker in pathophysiologische Untersuchungen von Haarerkrankungen aufgenommen werden sollten. Auch hier könnten nicht invasive Methoden, wie das Ziehen von Haarwurzeln mit nachfolgender Extraktion von Protein und RNA, wertvolle quantitative Daten liefern.

4.5 β -Defensine im Haut- und im Haarfollikel-Immunsystem

Haarfollikel interagieren eng mit dem Immunsystem der Haut. Sie üben eine bedeutende Rolle bei der Unterstützung der Immunüberwachung von Krankheitserregern aus (Yu et al., 2006). Haarfollikel werden als ein Teil des Barriersystems der Säugetierhaut beschrieben (Übersichtsartikel: Lauer et al., 1995; Schäfer und Lademann, 2001).

Die Haut ist ständig mit verschiedenen Krankheitserregern in Kontakt, die in der Umwelt anwesend sind. Der Haarfollikel ist ein besonderes Reservoir für die mikrobielle Invasion und sehr anfällig, da er für Mikroorganismen eine einfache Möglichkeit des Zugangs bietet. Trotzdem sind Infektionen und entzündliche Erkrankungen in der Haut und an den Haaren sehr selten. Das legt den Schluss nahe, dass die Haut mit ihren Anhangsgebilden über effektive Verteidigungsstrategien verfügt. Die effektive Abwehr von Bakterien ist für den menschlichen Körper überlebenswichtig. Insbesondere die Grenzflächen zur Außenwelt, wie die Haut, sind pathogenen und kommensalen Mikroorganismen ausgesetzt. Für die residente Hautflora nimmt der Haarfollikel eine besondere Funktion ein und bildet ein geschütztes Reservoir (Lovell, 1945; Montes, 1970; Selwyn, 1972; Fritsch, 2004; Hadaway, 2003).

Für die Interaktion zwischen Mikroflora und Wirtsorganismus haben insbesondere die körpereigenen Antibiotika, wie beispielsweise die β -Defensine, eine große Bedeutung.

Die menschliche Haut produziert außer antimikrobiellen Peptiden (β -Defensin), die mit hoher Wahrscheinlichkeit das Wachstum und die Zusammensetzung der normalen Hautflora kontrollieren, weitere β -Defensine. Mit ihnen wird wahrscheinlich eine Infektion im Anfangsstadium verhindert (Schröder 2001).

Die β -Defensine besitzen in erster Linie eine wichtige Abwehrfunktion gegen Infektionen in den epithelialen Zellen (McCray und Bentley, 1997; Hiratsuka et al., 1998). Defensine sind Teil unseres angeborenen Immunsystems (Oppenheim et al., 2003), deren Vorhandensein in der Epidermis von Mensch und anderen Säugetieren in den letzten Jahren nachgewiesen worden ist und deren Bedeutung wir gerade erst zu verstehen beginnen.

Eine der Hauptfunktionen der Defensine ist die Zerstörung oder Inaktivierung von Mikroorganismen. Dies macht sie zu wichtigen Effektoren des angeborenen Immunsystems (Lehrer und Ganz, 2002; Selsted, 2005). Zudem konnte kürzlich der Beweis erbracht werden, dass Defensine auch in die adaptive Immunität involviert sind, da sie in der Lage sind, immunkompetente Zellen an den Orten der Infektion und Entzündung zu rekrutieren (Yang et al., 2002).

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass wir insgesamt entlang dem Haarfollikel eine Gradierung immunsuppressiver und stimulierender Mediatoren finden, die direkt mit der Dichte von Immunzellen korreliert und bedingt, dass der oberflächliche, distale Bereich des Haarfollikels als Ort intensiver Interaktionen mit dem Immunsystem reich an immunstimulierenden Faktoren ist, während es proximal im Bereich der Stammzelle und des Bulbus geschützte Bereiche, die sogenannten immunprivilegierten Bereiche, gibt (Paus et al., 2005; Meyer et al., 2008; Lemos Piñeros et al., 2014) (Abb. 36 und 37).

Der direkte antimikrobielle Effekt der Defensine erfolgt *in vivo* vermutlich eher in den phagozytären Vakuolen der Phagozyten sowie auf der Oberfläche der Haut oder mukosaler Epithelien, wo geringere Ionenkonzentrationen herrschen (Ganz und Lehrer, 1998; Lehrer und Ganz, 1999). Daher könnte es möglich sein, dass die Immunmodulation die vorrangige Funktion der Defensine ist (Bowdish et al., 2005).

Es gibt verschiedene weitere Hinweise, dass β -Defensine eine wichtige Rolle im Immunsystem von Haut (Ali et al., 2001) und Haar (Philpott et al., 2003) spielen.

Meyer (2008) konnte eine Erhöhung der Expression von hBD-2 in der gesamten ÄWS des Sinushaarfollikels sowie substanziiell höhere Reaktionsintensitäten im Vergleich zu denen in den epidermalen Zellschichten aufweisen. Ob und welche Rolle hBD-2 zur Erhaltung des Immunprivilegs spielt, sollte in zukünftigen Versuchen weiter erforscht werden.

Gariboldi et al. (2008) berichteten, dass murine Haut, die mit niedermolekularer Hyaluronsäure (LMW-HA) behandelt wurde, eine murine β -Defensin-2-Expression in Haarfollikeln zeigte, was andeutet, dass die Anwendung von exogenem LMW-HA mittels topischer Applikation in der Lage ist, nicht nur die leicht zugänglichen Keratinozyten der Epidermis, sondern auch die schwieriger erreichbaren Haarkanäle zu stimulieren. Die Induktion von hBD-2 in Infundibulum und Talggang des Haarfollikels, die häufig Zugriffswege für eindringende Mikroorganismen darstellen, legt eine mögliche Verwendung von Hyaluronsäure als antimikrobiellen Peptidstimulator zur topischen Anwendung bei nachgewiesenen mikrobiell bedingten Haarerkrankungen nahe.

4.6 Die Rolle der Zytokine und der Toll-like-Rezeptoren bei β -Defensinen

β -Defensine können konstitutiv sezerniert werden. Ihre Expression kann aber auch durch Exposition gegenüber Bakterien und inflammatorischen Stimuli, wie z. B. über Zytokine, induziert werden. Es konnte bewiesen werden, dass pro-entzündliche Zytokine (wie IL-1 β , TNF- α und bakterielle Lipopolysaccharide) eine Überregulation von β -Defensinen erzeugen (Diamond et al., 1996; Harder et al., 1997; Stolzenberg et al., 1997; Ganz, 2003).

Durch Zytokine aktivierte Zellen zählen zur erworbenen Immunabwehr und führen somit zur Ausbildung einer protektiven Immunantwort. Dieser Mechanismus ist maßgeblich an der Ausbildung einer genetisch fixierten Resistenz beteiligt (Wilkie und Mallard, 1999). Auch für β -Defensine wurden zytokinähnliche Eigenschaften, im Sinne einer Vernetzung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem, festgestellt (Yang et al., 1999; 2002).

Die Zytokine sind eigentlich nicht für die normale Zellhomöostase wesentlich. Sie verändern den Metabolismus der Zellen insbesondere bei Störungen des Wirtsorganismus, wie z. B. bei Entzündungen oder anderen Immunprozessen, und dienen der Kommunikation der Abwehrzellen untereinander.

Ong et al. (2002) haben berichtet, dass IL-4 und IL-13 die Generation einer TNF- α - und IFN- γ -induzierten hBD-2- und hBD-3-Expression in den primär menschlichen Keratinozyten supprimieren.

Die Defensine übernehmen als Mediatoren eine wichtige Rolle bei akuter Infektion oder Entzündung. Sie stimulieren die Zytokinexpression vieler Immunzellen und rekrutieren als chemotaktische Faktoren weitere Effektoren der spezifischen sowie unspezifischen Abwehr (Agerberth et al., 2000; Scott et al., 2002; Yang et al., 2002; Yang et al., 2001). Damit stellen sie eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem her.

hBD-1

Die Expression von hBD-1 wurde als konstitutiv betrachtet (Zhao et al., 1996). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Expression auch durch eine Entzündung (Hiratsuka et al., 2003; Zhu et al., 2003) und andere nicht infektiöse Faktoren, wie eine Schwangerschaft (Feng et al., 2003), erhöht werden kann.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die hBD-1-Expression durch LPS- und Interferon (IFN)- γ überreguliert werden kann (Duits et al., 2002; Joly et al., 2005; Sørensen et al., 2005). hBD-1 ist einerseits stimulierbar (Joly et al., 2005), andererseits wurde im Rahmen von Entzündungsvorgängen eine Downregulation registriert (Dommisch et al., 2007; Islam et al., 2001; Zhu et al., 2003).

Sherman et al. (2006) berichten, dass Albumin und Aminosäuren die Expression des menschlichen hBD-1 hoch regulieren, was darauf hindeutet, dass hBD-1 auch über einen nicht entzündlichen Weg reguliert werden kann.

hBD-2

Es wurde beobachtet, dass ein Minimum an hBD-2 ohne Stimulation nachweisbar ist. Die Expression von hBD-2 erfährt nach Stimulation durch Zugabe von Zytokinen (in vitro) oder durch

eine Infektion (in vivo) eine erhebliche Intensitätssteigerung (Ashitani et al., 2001; Lehrer und Ganz, 2002; Harder et al., 2000; Hiratsuka et al., 1998).

Überregulierte Mediatoren für die verstärkte hBD-2-Expression in epithelialen Zellen sind pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 α (Moon et al., 2002; O’Neil et al., 2000), IL-1 β (Singh et al., 1998; Liu et al., 2002, 2003; Byeong-Churl et al., 2004; Joly, 2005), IL-22 (Wolk et al., 2004) und TNF- α (Harder et al., 1997; Joly, 2005). hBD-2 ist außerdem durch LPS oder auch L-Isoleucin induzierbar (Gallo et al., 1994; Harder et al., 1997; Stolzenberg et al., 1997). hBD-2 verbessert die IFN- und IL-10-Produktion und unterdrückt die IL-17-Produktion in T-Zellen (Kanda et al., 2011).

hBD-3

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Expression von hBD-3 durch Zytokine induziert werden kann (Harder et al., 2001; Garcia et al., 2001b). Für folgende Zytokine liegen Erfahrungen vor: TNF- α , IL-1 β , IFN- γ (Harder et al., 2001, 2004; Seo et al., 2001; Joly et al., 2005) sowie den insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) (Schröder und Harder, 2006; Sørensen et al., 2005).

Die Stimulation menschlicher Makrophagen mit hBD-3 induziert die Expression tumorfördernder Zytokine und Chemokine, einschließlich IL-1 α , IL-6, IL-8, CCL18, CCL24, und TNF- α . Diese Daten zeigen, dass hBD-3 eine wichtige Rolle bei der Bildung einer Tumor-assoziierten entzündlichen Umgebung durch die Rekrutierung von Monozyten aus dem peripheren Blut spielt und Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) zur Bildung von Chemokinen und Zytokinen simuliert, die das Wachstum und die Progression von Tumoren unterstützen (Jin et al., 2010).

Toll-like-Rezeptoren (TRL)

Menschliche Keratinozyten erkennen Mikroben über Toll-like-Rezeptoren (TLR), durch welche die hBD-Expression induziert werden kann (Horiuchi et al., 2008). Die Expression von β -Defensinen wird unter anderem durch Toll-like-Rezeptoren vermittelt (Bals et al., 2000b; Hornef et al., 2002; Schröder et al., 2006).

Ein zunehmender Konsens besteht darüber, dass TLRs einen entscheidenden Schlüssel zur Aktivierung der unspezifischen Immunantwort darstellen (Akira und Takeda, 2004). Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind überwiegend auf menschlichen Makrophagen exprimiert. Sie identifizieren allgemein molekulare Muster, die für Bakterien und andere Krankheitserreger, nicht aber für den Wirt typisch sind (Medzhitov, 2001).

Die Expression von hBD-2 und hBD-3 ist auch durch TLRs (Toll-like-Rezeptoren TLR2 und TLR4) hoch regulierbar und induzierbar (Horiuchi et al., 2008). Des Weiteren ist die Induktion von hBD-2 über TLR4 bekannt (Nagy et al., 2005). Ishikawa et al. (2009) weisen darauf hin, dass *T. rubrum* über den TLR2 und/oder TLR4 eine hBD-2-Expression in Keratinozyten induziert und hBD-2 eine Rolle bei der Abwehr kutaner Dermatophyteninfektionen spielen kann. Auch der TLR5 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Synthese von hBD-3 (Garcia et al., 2001b; Miller et al., 2005).

Selleri et al. (2007) zeigten, dass der Maus-Haarfollikel mit TLR2, TLR4 und TLR5 ausgerüstet ist und diese Rezeptoren fähig sind, auf mikrobielle Stimuli die β -Defensin-Produktion in Epithelzellen zu induzieren. Diese immune Antwort könnte wichtig sein, die Haut vor Mikroorganismuserkrankungen zu schützen.

Transformierender Wachstumsfaktor α (TGF- α)

Der transformierende Wachstumsfaktor α gehört zu den Signalmolekülen der Zytokine.

4.7 Die Rolle der β -Defensin-Zytokine bei Erkrankungen der Haut und des Haarfollikels

Ein gesteigerter Ausdruck von β -Defensinen in Keratinozyten konnte in entzündlicher Haut (Liu et al., 1998; Schmidt et al., 2001) nachgewiesen werden, wobei vor allem hBD-2 und hBD-3 im Epithel entzündeter Haut produziert werden (Harder et al., 2001). Ahrens et al. (2011) berichteten, dass eine mechanische und metabolische Schädigung der Hautbarriere zu einer erhöhten Expression des murinen β -Defensin-1, -3 und -14 führt. Zudem wurde nach einer Verletzung der Haut eine deutliche Hochregulation von hBD-2, hBD-3 identifiziert (Harder et al., 2010).

Eine Zunahme der Expression von β -Defensinen wurde jedoch auch bei anderen entzündlichen Prozessen der Haut beschrieben, so z. B. bei Psoriasis und Mastitis (Schonwetter et al., 1995; Stolzenberg et al., 1997; Schroder und Harder, 1999). Die Expression von hBD-2 wurde bei chronischen Wunden (Butmarc et al., 2004), bei der Candida-Leukoplakie (Abiko et al., 2002; Meyer et al., 2004; Schneider et al., 2005), der Infektion mit *Malassezia furfur* (Donnarumma et al., 2004) und der Tinea corporis (Jensen et al., 2007; Proksch et al., 2007) beschrieben, die von hBD-3 bei Lichen planus (Nishimura et al., 2003), die von hBD-2 und hBD-3 bei Lichen sclerosus (Gambichler et al., 2009) und die von hBD-1, hBD-2 and hBD-3 bei Pityriasis versicolor, Tinea inguinalis und Tinea pedis (Murat et al., 2013).

Die Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurde in humanen Papillomaviren (HPV) (Chong et al., 2006), die von hBD-2 und hBD-3 in Hautbiopsien aus Verrucae vulgares und Condylomata acuminata (Meyer-Hoffert et al., 2008) und bei analen intraepithelialen Neoplasien und Condylomata acuminata (Kreuter et al., 2009) festgestellt. Es ist unklar, ob die Hochregulation von hBD-2 und hBD-3 in HPV-infizierter Haut indirekt durch proinflammatorische Zytokine oder direkt durch virale Moleküle ausgelöst wird.

In einer Studie von Sun et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass hBD-2 bei Hauttuberkulose exprimiert wird und die Immunantwort beeinträchtigt. Zudem fehlte die Expression von hBD-3, dies könnte zur Pathogenese von Hauttuberkulose beitragen.

Kreuter und seine Arbeitsgruppe untersuchten die Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3, Psoriasin, LL-37, RNase 7 bei verschiedenen Subtypen des Lupus erythematoses, fast immer zeigte sich eine erhöhte Anzahl von AMP bei kutanem Lupus erythematoses (CLE) (Kreuter et al., 2011). Die Autoren gehen davon aus, dass dies die geringe Prävalenz von Hautinfektionen bei CLE bedingt.

Bei einer Entzündung der pilosebazeösen Einheit zeigten Philpott et al. (2003) eine verstärkte hBD-1- und hBD-2-Expression in den Läsionen von Akne vulgaris. Sie konnten interessanterweise eine gemäßigte Hochregulierung von hBD-1 IR in den meisten Akneläsionen, im Vergleich zu nicht läSIONaler Haut des gleichen Patienten und auch im Vergleich zu pilosebazeösen Follikeln der gesunden rückseitigen Hautpartien, beobachten, obgleich hBD-1 als konstitutiv und unter entzündlichen Bedingungen der Mundschleimhaut nicht überreguliert dargestellt wurde (Mathews et al., 1999). Aufgrund dieser Beobachtung kann konstatiert werden, dass hBD-1 und hBD-2 in Akneläsionen wahrscheinlich im Sinne einer sekundären Antwort auf die Periläsional-Infiltration hoch reguliert werden können und daher in der Pathogenese eine wesentliche Rolle spielen (Chronnell et al., 2001).

Auch bei speziellen Kopfhauterkrankungen wurde eine starke hBD-2-Expression in der folliculären Epidermis und den perifollikulär entzündlichen Zellen bei Malassezia-Follikulitis und Tinea capitis (Kwon et al., 2006) gefunden. Des Weiteren wurde hBD-2 reichlich in Läsionen einer oberflächlichen Follikulitis nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um eine typische Hautkrankheit, die durch Entzündungen der Haarfollikel und eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* geprägt ist (Oono et al., 2003).

Dies verdeutlicht die außerordentlich wichtige Rolle von β -Defensinen bei der Immunabwehr gegen Infektionen der Haut und Haarfollikel. Die β -Defensin-Expression könnte von pro-entzündlichen Zytokinen überreguliert, zumindest aber induziert werden (Diamond et al., 1996; Harder et al., 1997; Stolzenberg et al., 1997). Es gibt einen direkt oder indirekt positiven Einfluss der Zytokine auf die Expression von β -Defensinen in der Haut und den Haarfollikeln. In menschlichen Haarfollikeln konnte die Produktion von IL-1 β und TNF- α nachgewiesen werden (Boehm et al., 1995). In einem Mausmodell einer entzündlichen Hauterkrankung mit Haarausfall wurde ein erhöhter IL-1 α -Spiegel in der Epidermis nachgewiesen (Groves et al., 1995). Wahrscheinlich ist, dass dies mit einer Zunahme der β -Defensin-Expression assoziiert ist (Liu et al., 2002; Niyonsaba et al., 2007).

Andererseits beschrieben Ortega et al. (2000), dass die Expression von hBD-2 bei starken Verbrennungen in Brandwunden und in der Blisterflüssigkeit dramatisch zurückging. hBD-1, hBD-2 und hBD-3 waren hoch reguliert und wurden in einem anderen Expressionsmuster (da die Epidermis geschädigt ist) in verbrannter Haut gefunden (Kaus et al., 2008; Poindexter, 2005). Das beweist, dass sich das angeborene Immunsystem auf Defekte und auf die Gefahr von Brandwundinfektionen und Sepsis einstellen kann.

Bei der atopischen Dermatitis konnte bereits gezeigt werden, dass eine geringere Expression von hBD-3 (Ong et al., 2002) durch Hemmung von TNF- α und IFN- γ in entzündlichen Arealen vorliegt und ursächlich an der erhöhten Suszeptibilität der Patienten gegenüber Mikroorganismen beteiligt ist. Prado Montes de Oca et al. (2013) berichteten, dass sich das hBD-1-Allel und bestimmte Genotypfrequenzen wahrscheinlich auf die vermehrte Anfälligkeit einiger Ethnien für atopische Dermatitis auswirken. Das hBD-2 gilt als Marker für die Schwere der Erkrankung sowie den Zustand der Hautbarriere bei atopischer Dermatitis (Clausen et al., 2013).

Bei der Psoriasis vulgaris konnte dieses Zytokin-Ungleichgewicht hingegen nicht beobachtet

werden (Nomura et al., 2003). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Psoriasis mit einer erhöhten Anzahl von β -Defensin-Gen-Kopien assoziiert ist (Hollox et al., 2008). Mozeika et al. (2011) wiesen nach, dass hBD-2 in allen Arten von Hautproben, jedoch mit einer ausgeprägten Verteilung in entzündlicher psoriatischer Haut, exprimiert wurde. Neue Studien ergaben eine enge Beziehung zwischen hBD-2 und inflammatorischen Zytokinen im Serum von Psoriasis-Patienten. hBD-2 wirkte dabei stimulierend hinsichtlich einer erhöhten Produktion von Interferon gamma, TNF-alpha, IL-10, IL-1 beta, IL-6 und IL-22 als auch, durch die Unterdrückung von IL-17, regulierend oder, bei der IL-10-Produktion, anregend (Kanda et al., 2011).

Darüber hinaus spielen antimikrobielle Peptide eine Rolle bei der Angiogenese und der Wundheilung (Gennaro et al., 2002). hBD-3 fördert in infizierten diabetischen Wunden die Wundheilung (Hirsch et al., 2009). Die Defensine können mitogene Eigenschaften aufweisen, so stimulieren Defensine das Wachstum von Fibroblasten und Epithelzellen (Murphy et al., 1993) und zeigen ebenfalls positive, direkte Einflüsse auf Migration und Proliferation von Epithelzellen (Niyonsaba et al., 2007). Diese Daten legen nahe, dass β -Defensine eine Doppelrolle bei Hautverletzungen spielen. Außer der Vorbeugung mikrobieller Infektionen können sie auch den Wundheilungsprozess induzieren.

hBD-3 reagiert sensitiv auf den insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IFG-1) und auf TGF- α , beide Wachstumsfaktoren sind an der Wundheilung beteiligt (Sørensen et al., 2003; Sørensen et al., 2006). Beide Moleküle spielen eine wichtige Rolle in der Haarfollikel-Entwicklung und in Zyklen, die durch die dermale Papille gesteuert werden. Deren Rezeptoren befinden sich überwiegend in der darüberliegenden Matrixzelle (Danilenko et al., 1996).

4.8 β -Defensine und Neoplasien der Haut

Erst seit kurzem beschäftigt sich die medizinische Forschung mit der Bedeutung der β -Defensine bei malignen Erkrankungen. Dennoch liegen bereits zahlreiche Berichte vor, die auf eine bedeutende Rolle der β -Defensine bei der Tumorentstehung hinweisen.

Verminderungen der hBD-1-Expression wurden in Basalzellkarzinomen (Gamblicher et al. 2006), bei dem Plattenepithelkarzinom (Saklaoui 2012) und der Mycosis fungoides (Gambichler et al., 2007) festgestellt. Der hBD-1-Expression könnte eine Funktion als Tumorsuppressor zukommen (Han et al., 2014).

hBD-2 verstärkt die Progredienz dermalen Basalzellkarzinome und eventuell auch die der Mycosis fungoides, wobei Gambichler und andere Autoren diskutieren, ob die Überexpression von hBD-2 in der Mycosis fungoides nur durch die in der Epidermis vorhandenen T-Zellen induziert sein könnte (Gambichler et al., 2007). Gerashchenko et al. (2014) wiesen eine Beteiligung der hBD-2 bei der Regulation einer potenziellen Malignität kultivierter menschlicher Melanomzellen nach. hBD-2 fördert als Adjuvans Antimelanom-Immunantworten und hemmt das Wachstum von in vivo implantierten Maus-Melanomen (Mei et al., 2012). Die Arbeitsgruppe schließt daraus, dass die Entwicklung eines bestrahlten, auf Tumorzellen basierenden Impfstoffs mit hBD-2-Expression

eine viel versprechende Strategie für die Induktion einer wirksamen Antitumor-Immunität ist.

Die Expression von hBD-3 und LL-37 wurde im Kaposi-Sarkom als hoch reguliert festgestellt (Fathy et al., 2012). Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung beider antimikrobieller Peptide an der Pathogenese des Kaposi-Sarkoms hin. Kesting et al. (2009) stellten eine häufig gesteigerte Expression von hBD-3 im oralen Plattenepithel-Karzinom (OSCC) fest, die auf eine potenzielle Rolle bei dessen Pathogenese hindeutet. In-vitro-Untersuchungen (Winter et al., 2011) ergaben, dass durch Inkubation von OSCC-Zelllinien mit hBD-2 und hBD-3 die Proliferation der malignen Zellen angeregt wird. Die Autoren der Studie schlussfolgerten, dass es sich bei hBD-2 und hBD-3 um Protoonkogene handelt.

4.9 β -Defensine als Antibiotika und Immunmodulatoren der Zukunft

Wie In-vitro-Experimente belegen, wirken die β -Defensive hBD-1 bis -3 sowohl gegen Bakterien und Pilze als auch gegen Viren.

β -Defensine erweisen sich auch als hochpotent gegen Keime, die aufgrund von Resistenzen gegen etablierte Antibiotika im klinischen Alltag als hochgefährlich gelten.

Somit ergeben sich prinzipiell neue Überlegungen hinsichtlich der Behandlung von chronisch rekurrenden Infektionen der Haut oder von Haarfollikeln, da β -Defensine als natürliche Antibiotika eine Langzeitprophylaxe, gegebenenfalls auch in Zusammenhang mit gentherapeutischen Ansätzen, denkbar machen.

Ein Ansatz ist durch Schröder und andere Forscher gegeben, die bei der Suche nach einem Wirkstoff, der in der Lage ist, diesen körpereigenen Schutzmechanismus zu aktivieren, auf β -Defensine gestoßen sind (Schröder, 1999c). Das Ziel ist, die Haut dazu zu bringen, ihre Defensin-Produktion bei Vorliegen einer Entzündung zu verstärken. Eine andere Überlegung der Forscher geht dahin, dass Defensine unter Umständen zur Behandlung von Infektionen mit resistenten Erregern eingesetzt werden könnten.

Antimikrobielle Defensinpeptide könnten als wirksame Arzneimittel bei der Therapie mit natürlichen Antibiotika zur Anwendung kommen, vor allem dann, wenn bei resistenten Bakterienarten synthetische Antibiotika keine Wirkung erzielen. Das entsprechende Defensin könnte entweder synthetisch oder mittels rekombinanter DNA-Technologie hergestellt werden (Lalit et al., 2012).

Eine andere Arbeitsgruppe um Ganz und Liu entwickelte erstmals ein In-vivo-Modell zur antimikrobiellen Gentherapie mit hBD-2. Es gelang (Liu et al., 1998), dass alle transfizierten Zellen voll funktionsfähiges hBD-2 produzierten. Li et al. (2014) berichten, dass eine Gentherapie mit hBD-2 die Antitumor-Immunität induziert und die lokalen Antitumorwirkungen verbessert.

Noch stehen Untersuchungen zur Eignung der β -Defensine für therapeutische Zwecke und zur Infektionsprophylaxe aus. Weiter sollte geklärt werden, ob eine artifizielle Induktion der endogenen Produktion dieser Peptidantibiotika in der Haut als prophylaktischer Infektionsschutz

eingesetzt werden kann. Aufgrund seiner Eigenschaften ist insbesondere hBD-3 eine potenzielle Therapieoption zur Behandlung therapieresistenter Problemkeime und könnte angesichts der in Zusammenhang mit Hauterkrankungen sowie bei atopischer Dermatitis beschriebenen Mangelzustände auch präventiv von Nutzen sein.

Außerdem würden β -Defensine eine bedeutende Rolle bei Autoimmunerkrankungen des Haarfollikels spielen, deswegen könnten β -Defensine als immunmodulatorische Medikamente entwickelt werden.

Es wäre interessant, in weiteren Studien die Expression von β -Defensinen bei Haarerkrankungen zu untersuchen. Dabei sollte der Zusammenhang zwischen der Expression von β -Defensinen in menschlichen Haarfollikeln in Verbindung mit der Zytokin-Induktion untersucht werden.

Interessant ist ebenfalls, dass sich die Zytokinexpressionsmuster zwischen den verschiedenen Haarfollikeln z. T. deutlich weniger unterscheiden als zunächst erwartet. Die Talgdrüse spielt in den Vellushaarregionen des Gesichts nicht nur im Größenverhältnis zum recht kleinen Follikel eine besondere Bedeutung, sondern auch im Rahmen von Entzündungsprozessen wie der Akne vulgaris. Die Färbungen der Terminalhaarfollikel zeigten innerhalb der Follikel auch eine starke Expressivität deutlich unterhalb, also weiter proximal, des Talgdrüseneinführungsganges sowie unterhalb der Areale des Infundibulums, die typischerweise mikrobiell besiedelt sind. Diese wahrscheinlich regulatorische Rolle des Defensine am Haarfollikel ist bislang wenig untersucht. Weitere Erkenntnisse in diese Richtung könnten wertvolle Hinweise zur Haarzyklusregulation liefern, die über eine antimikrobielle Wirkung hinaus von therapeutischem Nutzen sein könnten. Ein Beispiel ist hier die kürzlich näher beschriebene Verknüpfung von Defensin-Mediatoren mit Komponenten des Melanokortin-Signalweges, welche nicht nur für Pigmentierungsprozesse, sondern auch für den Erhalt des Immunprivilegs am Haarfollikels von Bedeutung ist (Swopes et al., 2012; Nix et al., 2013).

Als Schlussfolgerung unterstützt diese Untersuchung den Beweis, dass β -Defensine in den menschlichen Haarfollikeln existent sind.

5 Zusammenfassung

Die Epithelien der Haut sind mit einer Flora aus verschiedenen Mikroorganismen besiedelt. Obwohl außer apathogenen Keimen auch fakultativ pathogene Keime vorhanden sind, kommt es nur selten zu Infektionen. Die Haut des Menschen als Organ der angeborenen Immunität hat außer ihrer Wirkung als chemische und physikalische Barriere auch eine Funktion als biochemische Barriere. Die Epithelzellen sowohl der Haut als auch der Haarfollikel können antimikrobielle Peptide synthetisieren.

Der Haarfollikel stellt eine Unterbrechung der kontinuierlichen Barriere der Haut dar. Dadurch stehen insbesondere das Haarfollikelostium und die distale äußere Wurzelscheide in direktem Kontakt mit der Außenwelt und stellen eine wichtige Eintrittspforte für die meisten pathogenen Erreger dar. Sie scheinen somit immunologische Schlüsselregionen zu sein, die protektive Mechanismen zur Infektionsverhinderung haben, wie z. B. die β -Defensin-hBD-1-, -hBD-2- und -hBD-3-Produktion. Humane β -Defensine sind antimikrobielle Peptide der angeborenen Immunabwehr mit einem breiten Wirkungsspektrum gegenüber grampositiven und -negativen Bakterien, Pilzen und einigen Viren. Außerdem wirken β -Defensine nicht nur als „natürliches Antibiotikum“, sondern üben auch immunmodulatorische Funktionen aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, immunhistochemische sowie immunfluoreszierende Methoden zur Darstellung der Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in menschlichen Haarfollikeln in Proben der Kopfhaut zu untersuchen. Von besonderem Interesse waren mögliche Unterschiede in den Expressionsmustern der verschiedenen Haarfollikeltypen und spezialisierter Regionen entlang der follikuloseboglandulären Einheit wie der Talgdrüse oder der Wulstregion.

Es wurden Biopsien gesunder Haut untersucht. Für die Darstellung der Expression wurden histologische Schnitte angefertigt und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen hBD-1, hBD-2 und hBD-3 immunhistochemisch, zur Validierung der Ergebnisse teils auch mittels Immunfluoreszenz, angefärbt. Danach wurde die Intensität der immunhistochemischen Reaktion gemessen und semiquantitativ ausgewertet.

In Bereichen, in denen von einer hohen immunologischen Aktivität ausgegangen werden kann, fanden wir in unserer Untersuchung entsprechend starke konstitutive Expressionsmuster der drei β -Defensine, z. B. in der distalen ÄWS um den Haarkanal herum und im Bereich der Einmündung der Talgdrüsengänge. Diese Ergebnisse entsprechen dem Konzept, dass diese Regionen in hohem Grade von Mikroorganismen besiedelt und Orte intensiver Interaktionen mit dem Immunsystem sind. Demgegenüber werden Haarfollikelabschnitte, wie die proximale ÄWS, die IWS und der Haarbulbus, selten einer Mikrobeninvasion ausgesetzt. In diesem Bereich war hBD-1 negativ mit Ausnahme der IWS.

Ein interessanter unerwarteter Befund war, dass hBD-2 und hBD-3 (THF, IHF und VHF) eine maximale Expression in den proximalen Haarfollikeln (insbesondere in beiden Anteilen der

inneren Wurzelscheide des Bulbus) ergaben. Diese Tatsache veranlasst uns zu der Hypothese, dass Haarwurzeln und der Haarbulbus mit assoziierten Melanozyten „potenzielle Fabriken“ für die antimikrobielle Produktion sein könnten. Es deutet auch darauf hin, dass inflammatorische Zytokine assoziiert sein könnten, welche die β -Defensin-Expression sowohl in den distalen als auch in den proximalen Follikeln überregulieren. Wie bekannt ist, wirken Zytokine immunmodulierend und dienen der Kommunikation der Abwehrzellen untereinander.

Ein anderer interessanter Befund war die Positivität von β -Defensin in den basalen Schichten des Wulstbereichs und in der zentralen ÄWS. Ob β -Defensine eine wichtige Rolle in den schützenden Stammzellen des Haarfollikels spielen, sollte weiter erforscht werden.

Andererseits wurden in der inneren Wurzelscheide maximal die drei β -Defensin-Expressionen aller Haartypen festgestellt, aber mit unterschiedlichen Verteilungen. Wahrscheinlich könnte dieser Sachverhalt mit einer β -Defensin-Überregulation assoziiert sein.

Als Besonderheit war in der Medulla (THF) eine stärkere Expression von hBD-1 und hBD-2 zu finden. Auch in der fibrösen Hülle und in der Grenzzone zwischen der äußeren und inneren Wurzelscheide konnte eine starke Immunfärbung von hBD-3 dargestellt werden. Deren funktionelle Bedeutung ist nicht eindeutig, jedoch wird vermutet, dass β -Defensine hier aufgrund der Relevanz dieses Bereichs als Schutz vor Infektionen agieren.

Aus den bisherigen Forschungsergebnissen konnte abgeleitet werden, dass hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im distalen Haarfollikel als immunstimulatorische Moleküle wirken und hBD-2 sowie hBD-3 im proximalen Haarfollikel als immunsuppressive Mediatoren fungieren. Diese immunmodulatorischen Eigenschaften von hBD-3 fungieren als Melanocortin-Rezeptor-Liganden (Nix et al., 2013).

Die Signifikanz der β -Defensine als Teil der angeborenen Abwehr liegt in der Erregerbekämpfung an Haut und Haarfollikeln als erster Barriere gegen infektiöse Mikroorganismen. Zusätzlich könnten β -Defensine, insbesondere das hBD-3, wichtige immunmodulatorischen Funktionen hinsichtlich des Immunprivilegs ausüben, so dass die Annahme berechtigt ist, dass β -Defensine eine bedeutende Rolle bei Autoimmunerkrankungen des Haarfollikels spielen. Hieraus ergeben sich interessante Ansatzpunkte hinsichtlich der Entwicklung neuer Arzneimittel oder Biomarker. Zukünftige Forschungen in diesem Bereich fokussieren sich auf die Erforschung der β -Defensin-Funktionen in Tiermodellen von Autoimmunerkrankungen, einschließlich gezielter Interventionen und Geninaktivierungsexperimente.

Als Schlussfolgerung unterstützt diese Untersuchung den Beweis, dass β -Defensine in den menschlichen Haarfollikeln vorkommen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Malek ZA, Supp D (2008) Beta-defensin 3: a novel and unexpected key that unlocks the melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 7–8
- Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi T, Nishimura M, Kusano K, Amaratunga, Shibata T, Kaku T. (2002) Upregulation of human beta-defensin 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis. *Pathol Res Pract* 189: 537–542
- Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96: 3086–3093
- Ahrens K, Schunck M, Podda GF, Meingassner J, Stuetz A, Schröder JM, Harder J, Proksch E (2011) Mechanical and metabolic injury to the skin barrier leads to increased expression of murine β -defensin-1, -3, and -14. *J Invest Dermatol* 131 (2):443-52
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499–511
- Akiyama M, Smith LT and Holbrook KA (1996) Growth factor and growth factor receptor localization in the hair follicle bulge and associated tissue in human fetus. *J Invest Dermatol* 106: 391–396
- Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG (2001) Expression of the peptide antibiotics human b-defensin-1 and human b-defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 117: 106–111
- Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S (2001) Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with *Mycobacterium avium*-intracellulare infection. *Chest* 4: 1131–1137
- Bals R, Goldman MJ and Wilson JM (1998a) Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun* 66: 1225–1232
- Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM (1998b) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102: 874–880
- Bals R (2000a) Epithelial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 1: 141–150
- Bals R (2000b) Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika. *Medizinische Klinik* 95: 496–502
- Baroni A, Donnarumma G, Paoletti I, Longanesi-Cattani I, Bifulco K, Tufano MA, Carriero MV (2009) Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Peptides* 30, 267–272
- Baxby D, Woodroffe RCS (1965) The location of bacteria on skin. *J Appl Bact* 28: 316–322
- Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A (1999) Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol* 163: 947–953
- Bensch K, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Letters* 368: 331–335
- Billingham RE, Silvers WK: A biologist's reflection on dermatology (1971) *J Invest Dermatol* 57: 495–499
- Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E, Oppenheim JJ, Kwak LW (2001) Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 167, 6644–6653
- Blume-Peytavi U, Ferracin J, Verschoore M, Czernielewski JM, and Schaefer H (1991) Physiology of the vellus hair follicle: hair growth and sebum excretion. *Br J Dermatol* 124: 21–28
- Blume-Peytavi U (1996) Die Kontrolle des Haarzyklus: Funktion und Bedeutung der dermalen Papille = Control of the hair growth cycle: Function of the dermal papilla and its significance. Blackwell, Berlin, 71 (6): 410–415
- Bøe R, Silvola J, Yang J, Moens U, McCray PB Jr, Stenfors LE and Seljfelid R (1999) Human beta-defensin-1 mRNA is transcribed in tympanic membrane and adjacent auditory canal epithelium. *Infect Immun* 67: 4843–4846
- Boehm KD, Yun JK, Strohl KP, Elmets CA (1995) Messenger RNAs for the multifunctional cytokines interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha are present in adnexal tissues and in dermis of normal human skin. *Exp Dermatol* 4: 335–341
- Böhm M, Luger TA (1998) The pilosebaceous Unit Is Part of the Skin Immune System. *Dermatology* 196: 75–79

- Boman HG (2000) Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 173: 5–16
- Bos JD (eds): *The Skin Immune System*. Boca Raton, CRC Press, 1997
- Bos JD, Pasch MC, Asghar SS (2001) Defensins and complement systems from the perspective of skin immunity and autoimmunity. *Clinics in dermatology* 19 (5): 563–572
- Bourne JA (1983) *Handbook of immunoperoxidase staining methods*. Bulletin published by Dako Corporation
- Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL (2005) Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 125: 9–13
- Brodell LA and Rosenthal KS (2008) *Skin Structure and Function. The Body's Primary Defense Against Infection. Infectious Diseases in Clinical Practice* 16: 2 113–117
- Brooke Peter: *Kleine Ungeheuer. Die geheime Welt der winzigen Lebewesen*. Gondrom-Verlag, (1999) S. 32–33
- Brown E, Wenzel RP, Hendley JO (1989) Exploration of the microbial anatomy of normal human skin by using plasmid profiles of coagulase-negative staphylococci. Search for the reservoir of resident skin flora. *J Infect Dis* 160: 644–650
- Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG, Hancock RE (2005) Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (5): 1727–1732
- Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock REW (2006) Immunomodulatory Properties of Defensins and Cathelicidins. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg CTMI 306: 27–66
- Bürkle CP S (2011) Die Expression antimikrobieller Peptide (Psoriasisin, HBD-2 und HBD-3) in menschlicher Haut und deren Modulation in vivo – eine Untersuchung im xenogenen Haut-Transplantationsmodell. http://www.qucosa.de/fileadmin/data/qucosa/documents/7382/DISS_C.P.B%C3%9CRKLE_distiller_3_106dpi_press_medium_UBL.pdf
- Butmarc J, Yufit T, Carson P, Falanga V (2004) Human beta-defensin-2 expression is increased in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 12 (4): 439–443
- Byeong-Churl J, Ki-Jo L, Ji-Hye P, Young-Kyu K, Sang-Woo S, Sang-Chan K, Tae-Young J, Taeg Kyu K, Jae-We C, Won-Ki B, Sang-Pyo K, Min-Ho S and Seong-II S (2004) Up-regulation of human β -defensin 2 by interleukin-1 β in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF- κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320 (3): 1026–1033
- Candille SI, Kaelin CB, Cattanauch BM, Yu B, Thompson DA, Nix MA, Kerns JA, Schmutz SM, Millhauser GL, Barsh GS (2007) A β -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science* 318: 1418–1423
- Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 56: 1–29
- Chadebech P, Goidin D, Jacquet C, Viac J, Schmitt D and Staquet MJ (2003) Use of human reconstructed epidermis to analyze the regulation of β -defensin hBD-1, hBD-2, and hBD-3 expression in response to LPS. *J cell biology and toxicology* 19 (5): 313–324
- Chase HB and Eaton GJ (1959) The growth of hair follicles in waves. *Annales of the New York Academy of Sciences* 83: 365–368
- Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Matsumoto N, Saito S, Nagaoka I, Ikeda S, Okomura K, Ogawa H (2007) Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur J Immunol* 37, 434–444
- Chong KT, Xiang L, Wang X, Jun EL, Xi L and Schweinfurth JM (2006) High level expression of human epithelial β -defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions. *Virology Journal* 3, 75
- Christoph T, Muller-Rover S, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, Rückert R and Paus R (2000) The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol* 142: 862–873
- Chronnell CM, Ghali LR, Ali RS, Quinn AG (2001) Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in acne vulgaris lesions. *J Invest Dermatol* 117 (5): 1120–1125
- Clausen ML, Jungersted JM, Andersen PS, Slotved HC, Kroghfelt KA, Agner T (2013) Human β -defensin-2 as a marker for disease severity and skin barrier properties in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 169 (3): 587–93
- Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J Biol Chem* 268: 19239–19245

- Cohen MC, Cohen S (1996) Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* 105: 589–598
- Commo S, Bernard BA (2000) Melanocyte subpopulation turnover during the human hair cycle: an immunohistochemical study. *Pigment Cell Res* 13: 253–9
- Cotsarelis G, Sun TT and Lavker R M (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61: 1329–1337
- Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, Hengge U, Bickenbach J (1999) Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions. *Exp Dermatol* 8: 80–88
- Dale BA, Krisanaprakornkit S (2001) Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity (Review article) *J oral Pathol Med* 30: 321–327
- Danilenko DM, Ring BD, Pierce GF (1996) Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy. *Mol Med Today* 2: 460–467
- De Jongh GJ, Zeeuwen PL, Kucharekova M, Pfundt R, van der Valk PG, Blokk W, Dogan A, Hiemstra PS, van de Kerkhof PC and Schalkwijk J (2005) High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 125, 1163–1173
- Di Nardo A, Braff MH, Taylor KR, Na C, Granstein RD, McInturff JE, Krutzik S, Modlin RL, Gallo RL (2007) Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J Immunol* 178: 1829–1834
- Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL and Bevins CL (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3952–3956
- Diamond G, Russell, JP, Bevins, CL (1996) Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5156–5160
- Dommisch H, Winter J, Willebrand C, Eberhard J, Jepsen S (2007) Immune regulatory functions of human beta-defensin-2 in odontoblast-like cells. *Int Endod J* 40 (4): 300–7
- Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Orlande M, Tufano MA, Baroni A (2004) Malassezia furfur induces the expression of beta-defensin-2 in human keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner. *Arch Dermatol Res* 295: 474–481
- Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH, Gallo RL (2001) Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A Streptococcus. *J Invest Dermatol* 117: 91–97
- Dorschner RA, Lin KH, Murakami M, Gallo RL (2003) Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: innate immunity during development of the adaptive response. *Pediatr Res* 53: 566–572
- Dressel S, Harder J, Cordes J, Wittersheim M, Meyer-Hoffert U, Sunderkötter C, Gläser R (2010) Differential expression of antimicrobial peptides in margins of chronic wounds. *Exp Dermatol* 19 (7), 628–632
- Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH (2002) Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* 106: 517–525
- Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S (2002) The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 110: 121–124
- Faergemann J, Alz R, Maibach HI (1983) Quantitative variations in distribution of *Pityrosporum orbiculare* on clinically normal skin. *Acta Derm Venerol* 63: 346–8
- Fathy H, Maha M, Amin MM, El-Gilany AH (2012) Upregulation of human β -defensin-3 and cathelicidin LL-37 in Kaposi's sarcoma. *F1000Res*. 2012; 1: 38
- Fearon D, Locksley R (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50–54
- Fehlbaum P, Rao M, Zasloff M, Anderson GM (2000) An essential amino acid induces epithelial beta-defensin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* (23): 12723–12728
- Feng Y, Pan X, Huang N, Feng Y, Wu Q, Wang B (2003) The human beta-defensins expression in female genital tract and pregnancy-related tissues. (Abstract). (Text chinesisich: *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*) 34 (2): 217–219

- Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Woff K, Freedberg IM and Austen KF. *Dermatology in general medicine*. Fourth Edition. (1993) New York, McGraw-Hill
- Fritsch P (2004) *Dermatologie und Venerologie*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg; 2. Auflage, S. 245–248, S. 297
- Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, Gudmundsson GH (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 272: 15258–15263
- Fujii G, Selsted ME, Eisenberg D (1993) Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci* 2: 1301–1312
- Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadowsky J, Harding CV, Weinberg A, Siegfried SF (2007) Human beta-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 18631–18635
- Gabay JE. Ubiquitous natural antibiotics. *Science* 1994; 264: 373–374
- Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, Bernfield M (1994) Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11035–11039
- Gallo RL, Huttner KM (1998) Antimicrobial peptides: An emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 111: 739–743
- Gambichler T, Skrygan M, Huyn J, Bechara FG, Sand M, Altmeyer P, Kreuter A (2006) Pattern of mRNA expression of β -defensins in basal cell carcinoma. *BMC Cancer* 6, 163
- Gambichler T, Skrygan M, Appelhans C, Tomi NS, Reinacher-Schick A, Altmeyer P, Kreuter A (2007) Expression of human beta-defensins in patients with mycosis fungoides. *Arch Dermatol Res* 299 (4), 221–224
- Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, Othlinghaus N, Brockmeyer NH, Altmeyer P, Kreuter A (2008) Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. *Int Arch Allergy Immunol* 147 (1), 17–24
- Gambichler T, Skrygan M, Tigges C, Kobus S, Gläser R, Kreuter A (2009) Significant upregulation of antimicrobial peptides and proteins in lichen sclerosus. *Br J Dermatol*. 161 (5), 1136–1142
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SSL, Daher K, Bainton DF, and Lehrer RI (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76: 1427–1435
- Ganz T, Lehrer RI (1997) Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr Opin Hematol* 4: 53–58
- Ganz T, and Lehrer RI (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 10: 41–44
- Ganz T, and Lehrer RI (1999) Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today* 5 (7): 292–297
- Ganz T (1999) Defensins and host defense. *Science* 286: 420–421
- Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 710–720
- García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann, K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG (2001a) Human b-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 15: 1819–1821
- García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jimenez J, Forssmann U, Adermann K, Kluver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R (2001b) Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 306: 257–264
- Gariboldi S, Palazzo M, Zanobbio L, Selleri S, Sommariva M, Sfondrini L, Cavicchini S, Balsari A and Rumio C (2008) Defense of Skin Epithelium by Induction of β -Defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J Immunol* 181; 2103–2110
- Gennaro R, Zanetti M, Benincasa M, Podda E, Miani M (2002) Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr Pharm Des* 8: 763–778
- Gera JF, and Lichtenstein (1991) A Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. *Cellular Immunology* 138: 108–120

- Gerashchenko O, Zhuravel E, Skachkova O, Khranovska N, Pushkarev V, Pogrebnoy P, Soldatkina M (2014) Involvement of human beta-defensin-2 in regulation of malignant potential of cultured human melanoma cells. *Exp Oncol* 36, 1, 17–23
- Gilliam AC, Kremer IB, Yoshida Y, Stevens SR, Tootell E, Teunissen MBM, Hammerberg C, Cooper KD (1998) The human hair follicle: a reservoir of CD 40+ B7 – deficient langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. *J Invest Dermatol* 110: 422–427
- Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E and Schröder JM (2005) Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 6: 57–64
- Grice EA, and Segre JA (2011) The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9(4): 244–253
- Groves RW, Mizutani H, Kieffer JD, Kupper TS (1995) Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 alpha in basal epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11874–11878
- Hadaway LC (2003) Skin flora and infection. *J Infus Nurs* 26 (1): 44–48
- Han Q, Wang R, Sun C, Jin X, Liu D, Zhao X, Wang L, Ji N, Li J, Zhou Y, Ye L, Liang X, Jiang L, Liao G, Dan H, Zeng X, Chen Q (2014) Human beta-defensin-1 suppresses tumor migration and invasion and is an independent predictor for survival of oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS One* 21; 9 (3)
- Hancock R, Chapple D (1999) Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1317–1323
- Hancock REW, and Diamond G (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 8, 402–410
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387: 861
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Bartels J, Schwichtenberg GL, Maune S, Schröder JM (2000) Mucoid *pseudomonas aeruginosa*, TNF- α and IL-1 β , but not IL-6 induce human β -defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 714–721
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276 (8): 5707–5713
- Harder J and Schröder JM (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277: 46779–46784
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM (2004) Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 123: 522–529
- Harder J, Schröder JM (2005) Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy* 86: 22–41
- Harder J, Dressel S, Wittersheim M, Cordes J, Meyer-Hoffert U, Mrowietz U, Fölster-Holst R, Proksch E, Schröder JM, Schwarz T, Gläser R (2010) Enhanced Expression and Secretion of Antimicrobial Peptides in Atopic Dermatitis and after Superficial Skin Injury. *J Invest Dermatol* 130 (5), 1355–1364
- Harrist TJ, Ruitter DJ, Mihm MC Jr, Bhan AK (1983) Distribution of mayor histocompatibility antigens in normal skin. *Br J Dermatol* 109: 623–633
- Headington JT (1984) Transverse microscopic anatomy of the human scalp. A basis for a morphometric approach to disorders of the hair follicle. *Arch Dermatol* 120 (4): 449–456
- Hendley JO, Ashe KM (1991) Effect of topical antimicrobial treatment on aerobic bacteria in the stratum corneum of human skin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35: 627–631
- Hiratsuka T, Nakasato M, Date Y, Minematsu T, Matsukura S (1998) Identification of hBD-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Comm* 249: 943–947
- Hiratsuka T, Mukae H, Iiboshi J, Ashitani K, Nabeshima T, Minematsu N, Chino T, Ihi S, Kohno S, and Nakazato M (2003) Increased concentrations of human β -defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Thorax* 58: 425–430
- Hirsch T, Spielmann M, Zuhaili B, Fossum M, Metzger M, Koehler T, Steinau HU, Yao F, Onderdonk AB, Steinstraesser L, Eriksson E (2009) Human beta-defensin-3 promotes wound healing in infected diabetic wounds. *J Gene Med.* 11 (3): 220–8
- Hoffmann R, and McElwee KJ (2003) Hair follicle mesenchymal stem cells and use thereof. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2003104443&IA=DE2003001863&DISPLAY=STATUS>

- Holbrook KA, and Minami SI (1991) Hair follicle embryogenesis in the human: characterization of events in vivo and in vitro. *Ann NY Acad Sci* 642: 167–196
- Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PL, Palla R, Lascorz J, Rodijk-Olthuis D, van de Kerkhof PC, Traupe H, de Jongh G, den Heijer M, Reis A, Armour JA, and Schalkwijk J (2008) Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet* 40 (1): 23–25
- Hoover DM, Rajashankar KR, Blumenthal R, Puri A, Oppenheim JJ, Chertov O, Lubkowski J (2000) The structure of human b-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem* 275: 32911–32918
- Horiuchi M, Saitoh M, Nakamura S, Yamazaki M, Nishimura M, Kurashige Y, Igarashi S, and Abiko Y (2008) Effect of Corticosteroid on Beta-defensins Expression Stimulated with TLR Agonists. *Bone Patholog, Metro Toronto Convention Centre Exhibit Hall D-E, Poster: 3529*
- Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S (2002) Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 3: 1033–1040
- Hristova K, Selsted ME, White SH (1996) Interactions of monomeric rabbit neutrophil defensins with bilayers: comparison with dimeric human defensin HNP-2. *Biochemistry* 35: 11888–11894
- Hsu SM, Raine L and Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577–580
- Huh WK, Oono T, Shirafuji Y, Akiyama H, Arata J, Sakaguchi M, Huh NH, Iwatsuki K (2002) Dynamic alteration of human beta-defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin. *J Mol Med* 80: 678–684
- Ishikawa H, Bae S and Katayama I (2009) Human β -Defensin-2 Expression by Keratinocytes is Induced by Co-Culture with *Trycophyton rubrum* Through Toll-Like Receptors 2 and 4. *The Open Dermatology Journal* 3: 81–85
- Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson GH (2001) Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: A novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 7: 180–185
- Ito M (1986) The innermost cell layer of the outer root sheath in anagen hair follicle: Light and electron microscopic study. *Arch Derm Res* 279: 112–119
- Jahoda CAB, Oliver RF: The dermal papilla and the growth of hair. In: Orfanos CE, Happle R (eds). *Hair and Hair Diseases*. Springer Verlag, Berlin (1990): 19–44
- Jahoda CA, Reynolds AJ (2001) Hair follicle dermal sheath cells: Unsung participants in wound healing. *Lancet* 358: 1445–1448
- Jensen JM, Pfeiffer S, Akaki T, Schröder JM, Kleine M, Neumann C, Proksch E, Brasch J (2007) Barrier Function, Epidermal Differentiation, and Human b-Defensin 2 Expression in *Tinea Corporis*. *J Invest Dermatol* 127 (7): 1720–1727
- Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB. Jr (2001) Discovery of new human β -defensins using a genomic-based approach. *Gene* 263, 211–218
- Jin G, Kawsar HI, Hirsch SA, Zeng C, Jia X, Feng Z, Ghosh SK, Zheng QY, Zhou A, McIntyre TM, Weinberg A (2010) An antimicrobial peptide regulates tumor-associated macrophage trafficking via the chemokine receptor CCR2, a model for tumorigenesis. *PLoS ONE* 5, e10993
- Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB Jr. Guthmiller JM (2005) Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 42: 1073–1084
- Jones DE, and Bevins CL (1992) Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267: 23216–23225
- Kaelin CB, Candille SI, Yu B, Jackson P, Thompson DA, Nix MA, Binkley J, Millhauser GL, and Barsh GS (2008) New ligands for melanocortin receptors. *International Journal of Obesity* 32, S19–S27
- Kanda N, Kamata M, Tada Y, Ishikawa T, Sato S, Watanabe S (2011) Human beta-defensin-2 enhances IFN gamma and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. *J Leukoc Biol*, 89, 935–944

- Kasumagic-Halilovic E, Prohic A, and Cavaljuga S (2011) Tumor Necrosis Factor-ALPHA In Patients with Alopecia Areata. *Indian J Dermatol* 56 (5): 494–496
- Kaus A, Jacobsen F, Sorkin, M, Rittig A, Voss B, Daigeler A, Sudhoff H, Steinau HU and Steinstraesser L (2008) Host defence peptides in human burns. *Burns* 34: 32–40
- Kesting MR, Loeffelbein DJ, Hasler RJ, Wolff KD, Rittig A, Schulte M, Hirsch T, Wagenpfeil S, Jacobsen F, Steinstraesser L (2009) Expression profile of human beta-defensin 3 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 27(5): 575–81
- Kiatsurayanon C, Niyonsaba F, Smithrithee R, Akiyama T, Ushio H, Hara M, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H (2014) Host defense (Antimicrobial) peptide, human β -defensin-3, improves the function of the epithelial tight-junction barrier in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 134 (8): 2163–73
- King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW (2003) Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium. *J Reprod Immunol* 59 (1): 1–16
- Kisich KO, Howell MD, Boguniewicz M, Heizer HR, Watson NU, Leung DY (2007) The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent in beta-defensin 3. *J. Invest. Dermatol.* 127: 2368–2380
- Kligmann AM (2000) *Acne and Rosacea*, Heidelberg, Springer Verlag, 30–31
- Kloepper JE, Tiede S, Brinckmann J, Reinhardt DP, Meyer W, Faessler R and Paus R (2008) Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche. *Exp Dermatol* 17: 592–609
- Körber A, Lehnen M, Grabbe S, and Dissemond J (2005) Humane β -Defensine: Eine Perspektive in der Aknetherapie?. *Dtsch Med Wochenschr* 4 (5): 210–212
- Kreuter A, Skrygan M, Gambichler T, Brockmeyer NH, Stücker M, Herzler C, Potthoff A, Altmeyer P, Pfister H, Wieland U (2009) Human papillomavirus-associated induction of human beta-defensins in anal intraepithelial neoplasia. *Br J Dermatol* 160 (6), 1197–1205
- Kreuter A, Jaouhar M, Skrygan M, Tigges C, Stücker M, Altmeyer P, Gläser R, Gambichler T (2011) Expression of antimicrobial peptides in different subtypes of cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 65 (1), 125–33
- Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA (1998) Expression of the peptide antibiotic human β -defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 66: 4222–4228
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW and Dale BA (2000) Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 68: 2907–2915
- Krutzik SR, Sieling PA, and Modlin RL (2001) The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection. *Curr Opin Immunol* 13: 104–108
- Kwon KS, Park HJ, Jang BS, Kim MB, Oh CK, Jang HS (2006) Immunohistochemical Study of Human beta Defensin-2 Expression in Superficial Mycosis. *Korean J Dermatol* 44 (5): 538–544
- Lako M, Armstrong L, Cairns PM, Harris S, Hole, N, Jahoda, CA (2002): Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system. *J Cell Sci* 115: 3967–3974
- Lalit LJ, Shah D, Rajesh KS (2012) Human defensin peptides with antimicrobial properties: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, Volume 13, Issue 1
- Lange-Asschenfeldt B, Marenbach D, Lang C, Patzelt A, Ulrich M, Maltusch A, Terhorst D, Stockfleth E, Sterry W, Lademann J (2011) Distribution of Bacteria in the Epidermal Layers and Hair Follicles of the Human Skin. *Skin Pharmacol Physiol* 24:305–311
- Lauer CA, Lieb LM, Ramachandran C, Flynn GL, Weiner ND (1995) Transfollicular drug delivery. *Pharmaceutical Res* 12: 179–186
- Lauer CA, Lieb LM, Ramachandran C, Flynn GL, Weiner ND (1995) Transfollicular drug delivery. *Pharmaceutical Res* 12: 179–186
- Lavker RM, Miller S, Wilson C, Cotsarelis G, Wei ZG, Yang JS, and Sun T (1993) Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. *J Invest Dermatol* 101: 16–26

- Lavker RM, Bertolino AP, Freedberg IM, Sun TT (1999) Biology of hair follicle. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB (eds). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. New York
- Lee DY, Yamasaki K, Rudsil J, Zouboulis CC, Park GT, Yang JM, Gallo RL (2008) Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to kill *Propionibacterium acnes*. *J Invest Dermatol* 128: 1863–1866
- Lee SH, Jeong SK, Ahn SK (2006) An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J* 47: 293–306
- Leeming JP, Holland KT, Cunliffe WJ (1984) The microbial ecology of pilosebaceous units isolated from human skin. *J Gen Microbiol* 130 (4): 803–7
- Lehrer RI, Ganz T (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 11: 23–27
- Lehrer RI, Ganz T (2002) Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14: 96–102
- Lehrer RI, (2004). Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2: 727–738
- Lemos Piñeros MA, Claudia Juliana Díaz Gómez CJ, Luis Hernando Moreno Macías LH (2014) El inmunoprivilegio del folículo piloso (Immune privilege of the hair follicle). *Med Cutan Iber Lat Am* 42 (4–6): 109–116
- Li D, Wang W, Shi H, Fu Y, Chen X, Chen X, Liu Y, Kan B, and Wang Y (2014) Gene Therapy with Beta-Defensin 2 Induces Antitumor Immunity and Enhances Local Antitumor Effects. *Human Gene Therapy* 25: 63–72
- Lillard JW, Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, McGhee JR (1999) Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Natl Acad Sci USA* 96, 651–656
- Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, Van der Veen C, and Paus R (1997) Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 151: 1601–1617
- Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore V, Liu L, Ganz T (2002) Human β defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1 bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* 118: 275–281
- Liu L, Wang L, Jia HP, Zhao C, Heng HHQ, Schutte BC, McCray PB Jr, and Ganz T (1998) Structure and mapping of the human-defensin hBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* 222: 237–244
- Liu L, Roberts AA, Ganz T (2003) By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 170: 575–580
- Lovell DL (1945) Skin bacteria. Their location with reference to skin sterilization. *Surg Gynecol Obstet* 80: 174–177
- Luger TA, Scholzen TE, Brzoska T, Bohm M (2003) New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann NY Acad Sci* 994: 133–140
- Maget-Dana R, Ptak M (1997) Penetration of the insect defensin A into phospholipid monolayers and formation of defensin A-lipid complexes. *Biophys J* 73: 2527–2533
- Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB Jr. (1999) Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 67: 2740–2745
- Matzinger P. (1998) An innate sense of danger. *Semin Immunol* 10: 399–415
- McBride M (1993) The skin microflora and microbial skin diseases. In: *The Skin Microflora and Microbial Skin Disease*. Noble W (ed.) Cambridge, New York, Oakleigh: Cambridge University Press
- McCray PB Jr, and Bentley L (1997) Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Bio* 16: 343–349
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135–142
- Medzhitov R, Janeway C (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295–298
- Mei HF, Jin XB, Zhu JY, Zeng AH, Wu Q, Lu XM, Li XB, Shen J (2012) β -defensin 2 as an adjuvant promotes anti-melanoma immune responses and inhibits the growth of implanted murine melanoma in vivo. *PLoS One* 7 (2): e31328
- Merlin D, Yue G, Lencer WL, Selsted ME, and Madara JL (2001) Cryptdin-3 induces novel apical conductance(s) in Cl secretory, including cystic fibrosis, epithelia. *Am J Physiol Cell* 280: 296–302
- Meyer JE, Harder J, Gorogh T, Weise JB, Schubert S, Janssen D, Maune S (2004) Human beta-defensin-2 in oral cancer with opportunistic *Candida* infection. *Anticancer Res* 24: 1025–1030

- Meyer KC, Kloeppe JE, Tiede S and Paus R (2007) Die Wulstregion des Haarfollikels – ein zweiter epithelialer immunologisch privilegierter Bereich innerhalb des Haarfollikels? Poster-Lübecker Doktorandentag
- Meyer KC, Klatte JE, Dinh HV, Harries MJ, Reithmayer K, Meyer W et al (2008) Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles. *Br J Dermatol* 159: 1077–85
- Meyer KC (2008) Detailed analysis of immunoprivileged tissues in skin appendages. http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/meyerk_ws08.pdf
- Meyer-Hoffert U, Wu Z, Cordes J, Wittersheim M, Gläser R and Schröder JM (2007) Hornerin is expressed in healthy and inflamed skin (Abstract). In *Exp Dermatol* 202
- Meyer-Hoffert U, Schwarz T, Schröder J-M, Gläser R (2008) Expression of human beta-defensin-2 and -3 in verrucae vulgares and condylomata acuminata. *J Acad Dermatol* 22 (9): 1050–1054
- Miller LS, Sørensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE, Chung W, Starner TD, Kim J, Sieling PA, Ganz T, Modlin RL (2005) TGF- α regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol* 174: 6137–6143
- Milner SM, Poindexter B, Buja M, Smith E, Bick R (2002) Localization of human Beta-Defensin in normal and burns skin by fluorescence deconvolution microscopy. *Burns* 1: 1–4
- Milner SM, Bhat S, Buja M, Gulati S, Poindexter BJ, Bick RJ (2004) Expression of human beta-defensin 2 in thermal injury. *Burns* 30 (7): 649–654
- Miyauchi S, Hashimoto K, Miki Y (1990) The innermost cell layer of the outer root sheath is positive with Ki-67. *J Invest Dermatol* 95: 393–396
- Mobini N, Tam S, Kamino H (2005) Possible role of the bulge region in the pathogenesis of inflammatory scarring alopecia: lichen planopilaris as the prototype. *J Cutan Pathol* 32: 675
- Moll R, Moll I, and Wiest W (1982) Changes in the pattern of cytokeratin polypeptides in epidermis and hair follicles during skin development in human fetuses. *Differentiation* 23: 170–78
- Montes LF, Wilborn WH (1970) Anatomical location of bacterial skin flora. *Arch Dermatol* 101 (2): 145–159
- Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE (2006) Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol* 176: 2455–2464
- Moon SK, Lee HY, Li JD, Nagura M, Kang SH, Chun YM, Linthicum FH, Ganz T, Andalibi A, Lim DJ (2002) Activation of a Src-dependent Raf-MEK1/2-ERK signaling pathway is required for IL-1 α induced upregulation of β -defensin 2 in human middle ear epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1590 (1–3): 41–51
- Morgera F, Pacor S, Creati L, Antcheva N, Vaccari L, and Tossi A (2011) Effects on antigen-presenting cells of short-term interaction with the human host defence peptide β -defensin 2. *Biochem J* 436, 537–546
- Mozeika E, Pilmane M, Kisis J (2011) Distribution of human B-defensin 2, TNF- α , IL-1 α , IL-6 and IL-8 in psoriatic skin. *Papers on Anthropology* XX, 289–302
- Murat K, Serpil O, Serap KA, Ebru C, and Mehtap A (2013) The Relationships of Cathelicidin, hBD-1, hBD-2 and hBD-3 in Patients With *P. versicolor*, *T. inguinalis* and *T. pedis* Infections. *Advances in Biological Research* 7 (6): 228–233
- Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW (1993) Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 155: 408–413
- Nagaoka I, Niyonsaba F, Tsutsumi-Ishii Y, Tamura H, Hirata M (2008) Evaluation of the effect of human beta-defensin on neutrophil apoptosis. *Int Immunol* 20, 543–554
- Nagy I, Pivarsci A, Koreck A., Szell M, Urban E, Kemeny L (2005) Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human-beta-Defensin-2 and Interleukin-8 expression in human keratinocytes through Toll-like receptors. *J Invest Dermatol* 124 (5), 931–938
- Nagy I, Pivarsci A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, Seltmann H, Patrick S, Zouboulis CC, Kemény L (2006) *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect* 8: 2195–2205

- Nakatsuji T, Kao M, Zhang L, Zouboulis C, Gallo R, and Huang M (2010) Sebum Free Fatty Acids Enhance the Innate Immune Defense of Human Sebocytes by Upregulating β -Defensin-2 Expression. *J Invest Dermatol* 130, 985–994
- Narisawa Y, Hasimoto K, and Kohda H (1993) Epithelial skirt and bulge of human facial vellus hair follicles and associated Merkel cell-nerve complexes. *Arch Dermatol Res* 285: 269–277
- Narisawa Y, Hashimoto K, Kohda H (1994) Immunohistochemical demonstration of keratin 19 expression in isolated human hair follicles. *J Invest Dermatol* 103: 191–195
- Narisawa Y, Kohda H, Tanaka T (1997) Three-dimensional demonstration of melanocyte distribution of human hair follicles: special reference to the bulge area. *Acta Derm Venereol* 77 (2): 97-101
- Nicolas P, Mor A (1995) Peptides as weapons against microorganism in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 94: 277–304
- Nishimura EK (2011) Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 401-4
- Nishimura M, Abiko Y, Kusano K, Yamazaki M, Saitoh M, Mizoguchi I, Jinbu Y, Noguchi T, Kaku T (2003) Localization of human β -defensin 3 mRNA in normal oral epithelium, leukoplakia, and lichen planus: an in situ hybridization study. *Med Electron Microsc* 36: 94–97
- Nix MA, Kaelin CB, Ta T, Weis A, Morton GJ, Barsh GS, Millhauser GL (2013) Molecular and functional analysis of human β -defensin 3 action at melanocortin receptors. *Chem Biol* 20; 20 (6): 784–95
- Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I (2001) Evaluation of the effects of peptide antibiotics human β -defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D2 production from mast cells. *Eur J Immunol* 31: 1066–1075
- Niyonsaba F, Iwabuchi K, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I (2002) Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol* 14, 421–426
- Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I (2004) Human β -defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumor necrosis factor- α -treated human neutrophils. *Immunol* 111: 273–281
- Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H (2005) The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol* 175, 1776–1784
- Niyonsaba F, Nagaoka I, and Ogawa H (2006) Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties. *Crit Rev Immunol* 26: 545–576
- Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H (2007) Antimicrobial peptides human β -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 127: 594–604
- Niyonsaba F, Nagaoka I, Ogawa H, and Okumura K (2009) Multifunctional antimicrobial proteins and peptides: natural activators of immune systems. *Curr Pharm Des* 15: 2393–2413
- Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, Pestonjamas V, Piraino J, Huttner K, Gallo RL (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414: 454–457
- Noble WC (1968) Observations on the surface flora of the skin and on the skin pH. *Brit J Dermatol* 80: 279–281
- Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY (2003) Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 171: 3262–3269
- Oliver RF (1991) Dermal-epidermal interactions and hair growth. *J Invest Dermatol* 96 (5): 76
- Oliver RF (1966) Whisker growth after removal of the dermal papilla and lengths of follicle in the hooded rat. *J Embryol Exp Morphol* 15: 331–347
- O’Neil DA, Cole SP, Martin-Porter E, Housley MP, Liu L, Ganz T, Kagnoff MF (2000) Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1. *Infect Immun* 68 (9): 5412–5415

- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 347: 1151–1160
- Oono T, Huh WK, Shirafuji Y, Akiyama H, Iwatsuki K (2003) Localization of human beta-defensin-2 and human neutrophil peptides in superficial folliculitis. *Br J Dermatol* 148: 188–191
- Oppenheim JJ, Biragyan A, Kwak LW and Yang D (2003) Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Annals of the Rheumatic Diseases* 62: 17–21
- Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T (2003) In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* 74: 180–182
- Ortega MR, Ganz T, Milner SM (2000) Human beta defensin is absent in burn blister fluid. *Burns* 26: 724–726
- Orwin DF (1971) Cell differentiation in the lower outer root sheath of the Romney wool follicle: a companion cell layer. *Aust J Biol Sci* 24: 989–999
- Panteleyev AA, Rosenbach T, Paus R and Christiano AM (2000a) The bulge is the source of cellular renewal in the sebaceous gland of mouse skin. *Arch Dermatol Res* 292: 573–576
- Panteleyev AA, Tadin M, Paus R and Christiano AM (2000b) Hair cycle-dependent expression patterns of the transcription factor AP-2 α in mouse skin. *J Invest Dermatol* 114: 795
- Panuitich A, Ganz T (1991) Activate 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 101–106
- Parakkal, PF (1990) Catagen and telogen phases of the growth cycle. In: Orfanos CE, Happle R (eds). *Hair and Hair Diseases*. Berlin: Springer-Verlag, S. 99–116
- Paus R, Eichmüller S, Hoffmann U, Czarnetzki BM (1994a) Expression of classical and nonclassical MHC class I antigens in murine hair follicles. *Br J Dermatol* 131: 177–183
- Paus R, Hofmann U, Eichmüller S, Czarnetzki BM (1994b) Distribution and changing density of gamma-delta T cells in murine skin during the induced hair cycle. *Br J Dermatol* 130: 281–289
- Paus R, Slominski A, Czarnetzki BM (1994c) Is alopecia areata an autoimmune-response against melanogenesis-related proteins, exposed by abnormal MHC class I-expression in the anagen hair bulb? *Yale J Biol Med* 66: 541–544
- Paus R, Handjiski B, Czarnetzki BM, Eichmüller S (1994d) Biology of the hair follicle. *Hautarzt* 45: 808–825
- Paus R (1996) Control of the hair cycle and hair diseases as cycling disorders. *Curr Opin Dermatol* 3: 248–258
- Paus R (1997) Immunology of the hair follicle. In: Bos JD (eds). *The Skin Immune System*, CRC Press, Boca Raton 377–398
- Paus R, van der Veen C, Eichmüller S, Kopp T, Hagen E, Müller-Röver S, Hofmann U (1998) Generation and Cyclic Remodeling of the hair Follicle Immune System in Mice. *J Invest Dermatol* 111: 7–18
- Paus R, Christoph T, and Müller-Röver S (1999) Hair follicle immunology: a short journey into terra incognita. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4 (3): 226–234
- Paus R, Cotsarelis G (1999) The biology of hair follicles. *N Eng J Med* 341: 491–497
- Paus R, Nickoloff BJ, Ito TA (2005) «hairy» privilege. *Trends in Immunology* 26: 32–40
- Paus R, Piker S, and Sundberg JP (2008) Biology of hair and nails. In *Dermatology*. Bologna, JL, Jorizzo JL, and Rapini RP (eds.) London: Mosby Elsevier, pp. 965–986
- Periathamby AR, and Dentino AR (2002) Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett* 206: 9–18
- Philpott MP (2003) Defensins and acne. *Mol Immunol* 40 (7): 457–462
- Poindexter BJ (2005) Immunofluorescence, deconvolution microscopy and image reconstruction of human defensins in normal and burned skin. *J Burns Wounds* 4: 128–140
- Poindexter BJ, Bhat S, Buja LM, Bick RJ, Milner SM (2006) Localization of antimicrobial peptides in normal and burned skin. *Burns* 32: 402–407
- Prado Montes de Oca E, Li W (2013) Human β -defensin 1 (DEFB1) allele and genotype frequencies probably impact on ethnic susceptibility to atopic dermatitis. *Int J Dermatol*. 52 (1): 115–7

- Proksch E, Pfeiffer S, Akaki T, Schroder J, Neumann C, Brasch J, Jensen J (2007) Disturbed skin barrier function and changes in epidermal differentiation including induction of human beta-defensin 2 expression in tinea corporis: P145. *Experim Dermatol* 16 (3): 239
- Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP and Mok SC (1998) Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *American Journal of Pathology* 152: 1247–1258
- Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y (1994) Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 76: 1063–1073
- Röckl H, Müller E (1959) Beitrag zur Lokalisation der Mikroben der Haut. *Archiv für klinische und experimentelle Dermatologie* 209: 13–29
- Röhrl J, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlhans T (2010) Human b-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J Immunol* 184, 6688–6694
- Roh C, Tao Q, Photopoulos C, and Lyle S (2005) In vitro differences between keratinocyte stem cells and transit-amplifying cells of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* 125: 1099–1105
- Roitt I, Brostoff J, Male D (1998) *Immunology*. 5 ed. London: Mosby
- Rückert R, Hofmann U, van der Veen C, Bulfone-Paus S, Paus R (1998) MHC class I expression in mouse skin: developmentally controlled and strikingly restricted intraepithelial expression during hair follicle morphogenesis and cycling, and response to cytokine treatment in vivo. *J Invest Dermatol* 111: 25–30
- Sakamoto N, Mukae H, Fujii T, Ishii H, Yoshioka S, Kakugawa T, Sugiyama K, Mizuta Y, Kadota J, Nakazato M, Kohno S (2004) Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production by cultures human bronchial epithelial cells. *Am J Phys Lung Cell Mol Phys* 288, L508–L513
- Solomon S, Hu J, Zhu Q, Belcourt D, Bennett HP, Bateman A, Antakly T. (1991) Corticostatic peptides. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40: 391–398
- Saklaoui H (2012) Expression antimikrobieller Peptide beim Plattenepithelkarzinom der Haut und seinen Vorläuferläsionen. <http://www-brs.ub.ruhr-uni-bochum.de/netahtml/HSS/Diss/SaklaouiHayat/diss.pdf>
- Sato-Kawamura M, Aiba S, Tagami H (2003) Strong expression of CD40, CD54 and HLA-DR antigen and lack of evidence for direct cellular cytotoxicity are unique immunohistopathological features in alopecia areata. *Arch Dermatol Res* 294 (12): 536–43
- Sawasaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Fukunaga J, Sugahara T (2002) Immunohistochemical study on expression of alpha-defensin and beta-defensin-2 in human buccal epithelia with candidiasis. *Oral Dis* 8: 37–41
- Schäfer H, Lademann J (2001) The role of follicular penetration: A differential view. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14: 23–27
- Schirren CG, Burgdorf WHC, Sander CA, and Plewig G (1997) Fetal and adult hair follicle: an immunohistochemical study fo anticytokeratin antibodies in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Am J Dermatopathol* 19: 334–340
- Schmid P, Grenet O, Medina J, Chibout SD, Osborne C, Cox DA (2001) An intrinsic antibiotic mechanism in wounds and tissue-engineered skin. *J Invest Dermatol* 116: 471–472
- Schmidtchen A, Frick I and Björck L (2001) Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Mol Microbiol* 39: 708–713
- Schnapp D, Reid CJ, Harris A (1998) Localization of expression of human beta defensin-1 in the pankreas and kidney. *J. Pathology* 186: 99–103
- Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC (2005) Human defensins. *J Mol Med* 83: 587–595
- Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA (1995) Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267: 1645–1648
- Schröder JM (1999a) Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci* 56: 32–46
- Schröder JM (1999b) Antimikrobielle Peptide – Antibiotika der Zukunft? *MMP* 9: 270–276
- Schröder JM (1999c) Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* 57: 121–134

- Schröder JM, Harder J (1999) Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 645–651
- Schröder JM, Harder J (2006) Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci* 63: 469–486
- Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW (2002) The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol* 169: 3883–3891
- Selleri S, Arnaboldi F, Palazzo M, Gariboldi S, Zanolobio L, Opizzi E, Shirai YF, Balsari A, Rumio C (2007) Toll-like receptor agonists regulate β -defensin 2 release in hair follicle. *Br J Dermatol* 156 (6): 1172–1177
- Selsted ME, Ouellette AJ (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunol* 6: 551–557
- Selwyn S, Ellis H (1972) Skin bacteria and skin disinfection reconsidered. *Br Med J* 1: 136–144
- Semple F, Webb S, Li HN, Patel HB, Perretti M, Jackson IJ, Gray M, Davidson DJ, Dorin JR (2010) Human beta-defensin 3 has immunosuppressive activity in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 40 (4): 1073–8
- Semple F, MacPherson H, Webb S, Cox SL, Mallin LJ, Tyrrell C, Grimes GR, Semple CA, Nix MA, Millhauser GL, Dorin JR (2011) Human beta-defensin 3 affects the activity of pro-inflammatory pathways associated with MyD88 and TRIF. *Eur J Immunol* 41: 3291–3300
- Semple F, Dorin JR (2012) beta-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immun* 4: 337–348
- Seo SJ, Ahn SW, Hong CK, Ro BI (2001) Expressions of beta-defensins in human keratinocyte cell lines. *J Dermatol Sci* 27: 183–191
- Serri F, Ceremeli D (1990) Embryology of hair follicle. In: Orfanos CE, Happle R (eds): *Hair and Hair Diseases*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 1–17
- Sharma S, and Khuller G (2001) DNA as the intracellular secondary target for antibacterial action of human neutrophil peptide-I against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Curr Microbiol* 43: 74–76
- Sherman H, Chapnik N, and Froy O (2006) Albumin and amino acids upregulate the expression of human beta-defensin 1. *Molecular Immunology* 43 (10): 1617–1623
- Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. (1998) Production of beta-defensin by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14961–14966
- Slominski A, Plonka PM, Pisarchik A, Smart JL, Tolle V, Wortsman J, Low MJ (2005) Preservation of eumelanin hair pigmentation in proopiomelanocortin-deficient mice on a nonagouti (a/a) genetic background. *Endocrinology* 146: 1245–1253
- Sommerville DA, Noble WC (1973) Microcolony size of microbes on human skin. *J Med Microbiol* 6: 323–328
- Sørensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Monch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N (2003) Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 170: 5583–5589
- Sørensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T (2005) Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 174: 4870–4879
- Soruri A, Grigat J, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J (2007) Beta-defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Eur J Immunol* 37, 2474–2486
- Stenn K, Parimoo S, Prouty S (1998) Growth of the hair follicle: a cycling and regenerating biological system. In: Chuong, CM: (ed.), *Molecular Basis of Epithelial Appendage Morphogenesis*. Landes Bioscience, Austin, TX 111–124
- Stenn KS, Paus R (2001) Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 81: 449–494
- Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M (1997) Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8686–8690
- Straille WZ, Chase HB, Arsenaault C (1961) Growth and differentiation of hair follicles between activity and quiescence. *J Exp Zool* 148: 205–222
- Sun Q, Tian S, Cai L, Zhang J (2012) Expressions of LL-37, human beta defensin-2 and-3 in lesions of cutaneous tuberculosis. *Chinese Journal of Dermatology* 45 (9): 662–664

- Sun TT, Cotsarelis G, Lavker RM (1991) Hair follicular stem cells: the bulge-activation hypothesis. *J Invest Dermatol* 96: 77–78
- Swope VB, Jameson JA, McFarland KL, Supp DM, Miller WE, McGraw DW, Patel MA, Nix MA, Millhauser GL, Babcock GF, Abdel-Malek ZA (2012) Defining MC1R regulation in human melanocytes by its agonist α -melanocortin and antagonists agouti signaling protein and β -defensin 3. *J Invest Dermatol* 132: 2255–62
- Takahashi M, Horiuchi Y, and Tezuka T (2004) Presence of bactericidal/permeability increasing protein in human and rat skin. *Exp Dermatol* 13: 55–60
- Tang Y-Q, Yuan J, Ösapay G, Ösapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted ME (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science* 286: 498–502
- Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E, Osaki T (2003) Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* 32 (10): 586–594
- Tatro JB, Sinha PS (2003) The central melanocortin system and fever. *Ann N Y Acad Sci* 994: 246–257
- Taylor G, Lehrer, MS, Jensen PJ, Sun T-T and Lavker RM (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102 (4): 451–461
- Taylor K, Clarke DJ, McCullough B, Chin W, Seo E, Yang D, Oppenheim J, Uhrin D, Govan JR, Campopiano DJ, Macmillan D, Barran PE, Dorin JR (2008) Analysis and separation of residues important for the chemoattractant and antimicrobial activities of beta-defensin 3. *J Biol Chem* 283: 6631–6639
- Tewary P, Li Z, de la Rosa G, Qian Chen Q, Oppenheim J, and Yang D (2008) Human Beta Defensin 3 (hBD3) induces migration and activation of antigen presenting cells and acts as an immune enhancer. *The FASEB Journal*. 22: 673.10
- Theiss C (2000) Neurotrophe Mechanismen während der Entwicklung des retino-tectalen Systems der Taube (*Columba livia*). <http://www-brs.ub.ruhr-uni-bochum.de/netahtml/HSS/Diss/TheissCarsten/diss.pdf>
- Thomas JA, Biggerstaff M, Sloane JP, Easton DF (1984) Immunological and histochemical analysis of regional variations of epidermal Langerhans cells in normal human skin. *Histochem J* 16 (5): 507–19
- Tiede S, Kloepper JE, Bodo E, Tiwari S, Kruse C, and Paus R (2007) Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur J Cell Biol* 86: 355–376
- Tobin DJ (2011) The cell biology of human hair follicle pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 75–88
- Tominaga T, Fukata J, Naito Y, Nakai Y, Funakoshi S, Fujii N, Imura H (1990) Effects of Corticostatin-I on rat adrenal cells in vitro. *J Endocrinol* 125: 287–292
- Uno H (1986) Biology of hair growth. *Semin Reprod Endocrinol* 4: 131–141
- Valore EV and Ganz T (1992). Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* 79: 1538–1544
- Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Ganz T (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101: 1633–1642
- Van Scott EJ, Ekel TM, and Auerbach R (1963) Determinants of rate and kinetics of cell division in scalp hair. *J Invest Dermatol* 41: 269–273
- Van Wetering S, Manesse-Lazeroms SPG, Dijkman J, Hiemstra PS (1997) Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells: Modulation of cytotoxicity and IL-8 production. *J Leukocyte Biol* 62, 217–226
- Van Wetering S, Sterk PJ, Rabe KF, Hiemstra PS (1999) Defensins: Key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung? *J Allergy Clin Immunology* 104, 1131–1138
- Vogt A, Hadam S, Heiderhoff M, Audring H, Lademann J, Sterry W, Blume-Peytavi U (2007) Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol* 16(11): 946–50
- Westgate GE, Craggs RI, Gibson WT (1991) Immune privilege in hair growth. *J Invest Dermatol* 97: 417–420
- Whiting DA (2000) Histology of Normal Hair. In: Hordinsky M, Sawaya M, Scher R (eds). *Atlas of Hair and Nails*. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, S. 9–23
- Whiting DA (2001) Possible mechanisms of miniaturisation during androgenetic alopecia or pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 45: 87–94

- Wilde CG, Griffith JE, Marra MN, Snable JL, and Scott RW (1989) Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem* 264: 11200–11203
- Wilkie BN, Mallard B (1999) Selection for high immune responses: an alternative approach to animal health maintenance? *Vet Immunol Immunopathol* 72: 231–235
- Wimley WC, Selsted ME, White SH (1994) Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* 3: 1362–1373
- Winter J, Pantelis A, Reich R, Martini M, Kraus D, Jepsen S, Allam JP, Novak N, Wenghoefer M (2011) Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *Cancer Invest* 29: 196–201
- Wolff HH, Plewig G (1976) Ultrastruktur der Mikroflora in Follikeln und Komedonen. *Der Hautarzt* 27: 432–440
- Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R (2004) IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21: 241–254
- Wu M, Sharon A, McClellan SA, Barrett RP, and Hazlett LD (2009) β -Defensin-2 Promotes Resistance against Infection with *P. aeruginosa*. *J Immunol* 182: 1609–1616
- Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulegue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W (2003) Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8880–8885
- Wu Z, Bartels J and Schröder JM (2008) Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI)-2: a novel epithelial peptide antibiotic (Abstract) *Exp Dermatol* 17: 260
- Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y (2002) Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol*; 169 (5): 2516–2523
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525–528
- Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ (2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract native T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 68: 9–14
- Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ (2001) Participation of mammalian defensins and cathelicidins in antimicrobial immunity: receptors and activities in human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol* 69 (5): 691–697
- Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23: 291–296
- Yang D, Liu ZH, Tewary P, Chen Q, de la Rosa G, Oppenheim JJ (2007) Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr Pharm Des* 13, 3131–3139
- Yu M, Finner A, Shapiro J, Lo B, Barekatin A, and McElwee KJ (2006) Hair follicles and their role in skin health. *Exp Rev of Dermatol* 6: 855–871
- Zhang X, Yu M, Yu W, Weinberg J, Shapiro J, McElwee KJ (2009) Development of alopecia areata is associated with higher central and peripheral hypothalamic-pituitary-adrenal tone in the skin graft induced C3H/HeJ mouse model. *J Invest Dermatol* 129 (6): 1527–38
- Zhao CQ, Wang I, and Lehrer RI (1996) Widespread expression of beta-defensin HBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 396: 319–322
- Zhu BD, Feng Y, Huang N, Wu Q, and Wang BY (2003) Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) enhances human-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin* 24: 907

7 Anhang

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: β -Defensine	16
Tab. 2: Färbeprotokoll für Immunhistochemie	36
Tab. 3: Verwendete Primärantikörper.....	39
Tab. 4: Verwendete Normalseren und Sekundärantikörper.....	39
Tab. 5: Chemikalien und Reagenzien.....	40
Tab. 6: Geräte und Zubehör	41
Tab. 7: Fluoreszenzfarbstoffe, Filtermodul, Anregungsfilter und Emission	42
Tab. 8: Färbeprotokoll für Immunfluoreszenz	43
Tab. 9: Verwendete Primärantikörper	44
Tab. 10: Verwendete AB-Seren und Sekundärantikörper.....	45
Tab. 11: Verwendete Sekundärantikörper.....	45
Tab. 12: Reagenzien	45
Tab. 13: Benutzte Geräte.....	46
Tab. 14: Übersicht über das untersuchte Material und die jeweils ausgewerteten Haarfollikeltypen	49
Tab. 15: Durchschnittliche Expression der einzelnen β -Defensine in Terminalhaarfollikeln	50
Tab. 16: Durchschnittliche Expression der einzelnen β -Defensine in Intermediärhaarfollikeln	51
Tab. 17: Durchschnittliche Expression der einzelnen β -Defensine in Vellushaarfollikeln.....	52
Tab. 18: Expression von β -Defensin in gesunder Epidermis	53
Tab. 19: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaarfollikelbereich des Haarbulbus	55
Tab. 20: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaarfollikel in der suprabulbären Region	57
Tab. 21: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaarfollikel im Wulst	59
Tab. 22: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Terminalhaarfollikeln im Isthmus und im suprasedoglandulären Bereich.....	60
Tab. 23: Expression in Terminalhaarfollikeln im Infundibulum	60
Tab. 24: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in den Talgdrüsen des Terminalhaarfollikelapparates	61

Tab. 25: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaarfollikel im Bereich des Haarbulbus	63
Tab. 26: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaarfollikel in der suprabulbären Region	64
Tab. 27: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaar- und Intermediärhaarfollikel im Wulst	66
Tab. 28: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaar- und Intermediärhaarfollikel im Isthmus und suprasedoglandulär Bereich	67
Tab. 29: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vellushaar- und Intermediärhaarfollikel im Infundibulum	69
Tab. 30: Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Talgdrüsen des Vellushaarfollikelapparates	70
Tab. 31: Gegenüberstellung der Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Terminalhaar-, Intermediärhaar- und Vellushaarfollikeln im Bereich des Haarbulbus	71
Tab. 32: Gegenüberstellung der Ergebnisse des immunhistochemischen Färbeverhaltens der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in verschiedenen Anteilen bzw. Schichten der Terminalhaar-, Intermediärhaar- und Vellushaarfollikel in der suprabulbären Region	74
Tab. 33: Gegenüberstellung der Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Terminalhaar-, Intermediärhaar- und in Vellushaarfollikeln des Wulstes.....	77
Tab. 34: Gegenüberstellung der Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaar-, Intermediärhaar- und Vellushaarfollikel im Isthmus sowie im suprasedoglandulären Bereich	78
Tab. 35: Gegenüberstellung der Expression der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Terminalhaar-, Intermediärhaar- und im Vellushaarfollikel des Infundibulum	80
Tab. 36: Gegenüberstellung des immunhistochemischen Färbeverhaltens der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Talgdrüse des Terminalhaar-, Intermediärhaar- und Vellushaarfollikels.....	82
Tab. 37: Gegenüberstellung des immunhistochemischen Färbeverhaltens der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Schweißdrüse	84
Tab. 38: Auffälliges Expressionsverhalten der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in den verschiedenen Anteilen/Schichten des Terminalhaarfollikel- (THF) und Vellushaarfollikelapparates (VHF)	87
Tab. 39: Zusammenfassung der Untersuchungen zur Immunfluoreszenz.....	97
Tab. 40: Immunmodulatorische Funktionen von humanen β -Defensinen	106

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Antimikrobielle Peptide: Effektormoleküle der Haut als Abwehrorgan	13
Abb. 2: Darstellung verschiedener Mediatorfunktionen humaner Defensine auf Gewebe und Zellen in Anlehnung an Lehrer (2004).....	18
Abb. 3: Schematische Abbildung der potenziellen Mechanismen, durch die α - und β -Defensine die adaptive Immunität erhöhen.	19
Abb. 4: Das Teppich-Wurmlochmodell der Aktion von Defensinen.	20
Abb. 5: Histomorphologischer Aufbau eines menschlichen Terminalhaarfollikels in seiner charakteristischen Gliederung.....	21
Abb. 6: Schematischer Aufbau des VHF.....	25
Abb. 7: Verteilung der physiologischen Mikroflora im Haarfollikel	27
Abb. 8: Schematische Darstellung der Immunologie des Haarfollikels	30
Abb. 9: Die Antikörper-ABC-Bindungskaskade.....	34
Abb. 10: Fluoreszenz-Immunhistochemie.	42
Abb. 11: Anfärbung der Epidermis	53
Abb. 12: Anfärbung der inneren Wurzelscheide im Bulbus.....	56
Abb. 13: Anfärbung der inneren Wurzelscheide mit den polyklonalen Ak hBD- 1, hBD-2 und hBD-3	58
Abb. 14: Anfärbung des Isthmus und des Wulstes mit den polyklonal. Ak hBD-1, hBD-2 und hBD-3	60
Abb. 15: Anfärbung des Infundibulum mit den polyklonal. Ak hBD-1, hBD-2 und hBD-3.....	61
Abb. 16: Anfärbung von Talgdrüsen	62
Abb. 17: Anfärbung des Bulbus	63
Abb. 18: Anfärbung der Suprabulbärbereiche.....	65
Abb. 19: Anfärbung von Wulst und Isthmus mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3.....	68
Abb. 20: Anfärbung des Infundibulum mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3.....	69
Abb. 21: Anfärbung der Talgdrüse mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3	70
Abb. 22: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Bulbus der drei Haartypen.....	72

Abb. 23: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im suprabulbären Bereich der drei Haartypen	75
Abb. 24: Gegenüberstellung des unterschiedliche Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensinen hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Isthmus und Wulst der drei Haartypen	79
Abb. 25: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Infundibulum der Terminal- und Vellushaarfollikel	81
Abb. 26: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Talgdrüse von Terminal- und Vellushaarfollikeln	83
Abb. 27: Gegenüberstellung des unterschiedlichen Färbeverhaltens mit den polyklonalen Ak β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Schweißdrüse	85
Abb. 28: Auffälliges Expressionsverhalten der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3	88
Abb. 29: Auffälliges Expressionsverhalten der β -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3	89
Abb. 30: β -Defensin-Immunreaktivität in Epidermis und distalen Terminalhaarfollikeln	91
Abb. 31: hBD-1-Immunreaktivität im Suprabulbärbereich (SB)	92
Abb. 32: hBD-2-Immunreaktivität im Bulbus- und Suprabulbärbereich von Terminalhaarfollikeln	93
Abb. 33: hBD-3-Immunreaktivität im Bulbus-, im Suprabulbär- und im Wulstbereich des Terminalhaarfollikels	95
Abb. 34: Besonderheit der Immunfluoreszenz	96
Abb. 35: Vergleich zwischen Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	98
Abb. 36: Die Verteilung von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Terminalhaarfollikeln	102
Abb. 37: Die Verteilung von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Vellushaarfollikeln	102
Abb. 38 β -Defensin als Immunmodulator	104

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Publikationen

Luya, L., Echevarría, C., Sanchez, G., Navarro, P.(1999): Erupción variceliforme de Kaposi en pacientes con pénfigo. In: Revista Dermatología peruana. Vol. 9, N. 1

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v09_n1/erupcion_variceliforme.htm

(deutsche Übersetzung: Luya, L., Echevarría, C., Sanchez, G., Navarro, P. (1999): Kaposi Varicelliform Eruption (KVE) bei Pemphigus foliaceus. In: Zeitschrift der peruanischen Gesellschaft für Dermatologie. Vol. 9, Nr. 1)

Echevarría, C., Navarro, P., Luya, L., Begazo, J.(1998): Manifestaciones cutáneas de la infección por HTLV-1. Revista Dermatologica.

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/es_set1998/trabajoscartel03.htm#TC-23

(deutsche Übersetzung: Echevarría, C., Navarro, P., Luya, L., Begazo, J. (1998): Dermatologische Krankheitsbilder bei HTLV-1-Infektionen. In: Zeitschrift der peruanischen Gesellschaft für Dermatologie)

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Leys Anita Luya Estrada, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Expression von β -Defensinen in menschlichen Haarfollikeln“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE-www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

25.05.16 Berlin

Unterschrift

11 Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Blume-Peytavi für die Überlassung des Themas und die sorgfältige Betreuung bedanken. Insbesondere möchte ich das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Übernahme der kritischen Begutachtung meiner Arbeit hervorheben.

Mein ganz spezieller Dank geht an Frau Dr. med. Annika Vogt für die stets engagierte und freundschaftliche Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Zuberbier danke ich für die Möglichkeit, an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie (Hautklinik) der Charité-Universitätsmedizin Berlin, zu promovieren.

Mein tiefster Dank geht an Frau Hadam für die Einführung in die labortechnischen Arbeiten und ihre hilfreiche Unterstützung.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern der Hautklinik der Charité meinen Dank für ihre freundliche Unterstützung aussprechen.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern.